

**ZUM STOFFWECHSEL VON AMMONIAK UND
SEINER BEZIEHUNG ZUR
PYRUVATDEHYDROGENASE
IN DER LEBER DER RATTE**

Dieter Häußinger

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553812_0096

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
und Physikalische Biochemie der Universität München
Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher
Prof. Dr. E.M. Klingenberg - Prof. Dr. H.G. Zachau

ZUM STOFFWECHSEL VON AMMONIAK UND SEINER BEZIEHUNG ZUR
PYRUVATDEHYDROGENASE IN DER LEBER DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dieter Häußinger

aus Nördlingen

1975

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. H. Sies
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 1976



Meinen Eltern und meiner Tante
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

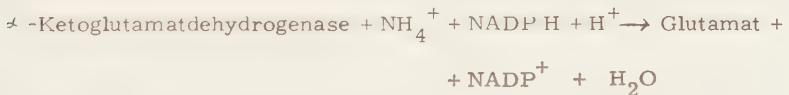
	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. METHODIK	4
2.1. Hämoglobinfreie Leberperfusion im offenen System	4
2.2. Organspektrophotometrie	5
2.3. Analysen	6
2.3.1. Extraktbereitung	6
2.3.2. Präparation des Mitochondrienhomogenats	6
2.3.3. Metabolitanalysen	7
2.3.4. Bestimmung der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase im Gewebe	12
2.3.5. Bestimmung der Aktivität der Glutaminase im Mitochondrienhomogenat	13
2.3.6. $^{14}\text{CO}_2$ Produktion aus ^{14}C -markierten Substanzen	13
2.4. Verwendete Reagenzien und Geräte	13
3. ERGEBNISSE	15
3.1. Metabolische Effekte bei Infusion von Ammoniumchlorid	15
3.1.1. Übersicht über den Stoffwechsel von Ammoniumionen	15
3.1.2. Stoffwechsel von Ammoniumionen in der perfundierten Rattenleber	19
3.1.2.1. Veränderungen im pH bei Infusion von Ammoniumchlorid	19
3.1.2.2. Harnstoffproduktion und Sauerstoffaufnahme	23
3.1.2.3. Aminosäureproduktion und Stickstoffbilanz	25
3.1.3. Begleitende Stoffwechseleffekte	29
3.2. Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase	33
3.2.1. Kontrolle der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase	33

	Seite
3.2.2. Effekt von Ammoniumionen auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase	35
3.2.3. Energieverbrauch bei der Harnstoffsynthese und Aktivität der Pyruvatdehydrogenase	38
3.2.4. Einfluß von Ammoniumionen auf den mitochondrialen Redoxzustand und seine Beziehung zur Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase durch Ammoniumionen	42
3.2.5. Ammoniumionen bedingte Pyruvataufnahme während Glucogenese und Anoxie	48
3.2.6. Hemmung der Pyruvatdehydrogenase und Glutaminmetabolismus	50
4. DISKUSSION	56
4.1. Einfluß des Stoffwechsels von Ammoniumionen auf den Aktivitätszustand der Pyruvatdehydrogenase	56
4.2. Ammoniakkbilanz und Mehratmung	60
5. ZUSAMMENFASSUNG	62
6. LITERATUR	64
ANHANG: Verwendete Abkürzungen Enzyme	73

1. EINLEITUNG

Obwohl der Stickstoffmetabolismus des tierischen Organismus weitgehend durch stickstofforganische Verbindungen gekennzeichnet ist, spielt auch der in Form des Ammoniumions vorliegende freie Ammoniak eine wichtige Rolle unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen (1 - 3). In Organen wie Leber, Muskel (vgl. Abb. 1) sowie Niere und Gehirn kommen Enzyme vor, die Ammoniak binden oder freisetzen können. Unsere Kenntnis über den speziellen Stoffwechsel der Aminosäuren und der Basen der Purin- und Pyrimidinreihe hat in den letzten Jahren stark zugenommen, während zur Bedeutung des freien Ammoniaks im Intermediärstoffwechsel vergleichsweise wenig neuere Ergebnisse vorliegen (4).

Hinsichtlich der Ammoniakfixierung kommt in der Leber der Glutamatdehydrogenase eine Schlüsselposition zu.



Mit dieser reduktiven Aminierung ist zum einen eine Veränderung des Redoxzustandes der Nikotinamidnukleotide, zum anderen durch Verbrauch von α -Ketoglutarat eine Beeinflussung des Zitronensäurezyklus verbunden.

Die Einschleusung von Pyruvat, dem Produkt der Glykolyse, in den Zitronensäurezyklus geschieht mit Hilfe des Multienzymkomplexes Pyruvatdehydrogenase, der die folgende Nettoreaktion katalysiert:



Diese oxidative Decarboxylierung unterliegt einer Reihe von Regulationen, welche neben den allgemeinen Substrat- und Produkteffekten auch das System der kovalenten Interkonversion durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung umfassen. Bisher sind wenige metabolische Effekte auf den stationären Zustand der Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase bekannt (5, 6). Über einen weiteren, durch den Ammoniakstoffwechsel vermittelten Effekt auf den Phosphorylierungsgrad der Pyruvat-

dehydrogenase soll in dieser Arbeit berichtet werden. Dadurch ergeben sich neue Aspekte zum Verständnis der metabolischen Rolle des freien Ammoniaks.

Die Experimente wurden an der isolierten, hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber durchgeführt (87, 8, 9). Dieses in vielfacher Hinsicht gut charakterisierte System bietet durch Trennung vom übrigen Organismus die Möglichkeit einer isolierten Untersuchung der Stoffwechselleistung dieses Organs.

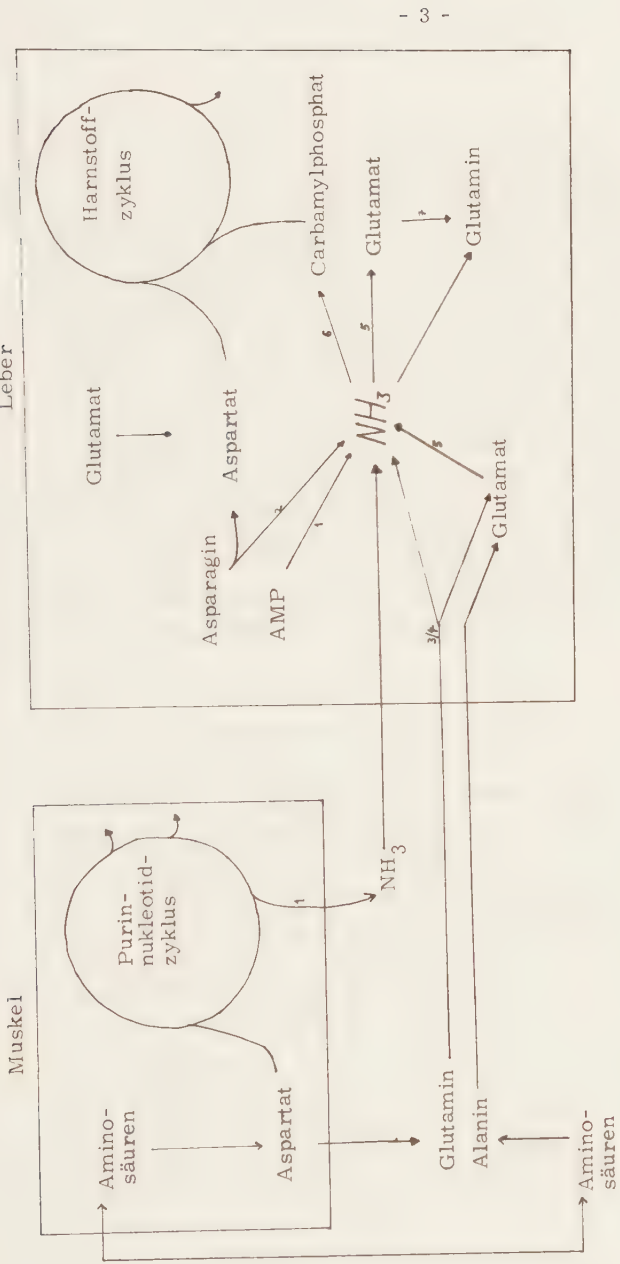


Abb. 1

Schematische Darstellung ammoniakfixierender und ammoniakbildender Reaktionen in Leber und Muskel

2. METHODIK

2.1. Hämoglobinfreie Leberperfusion im offenen System

Männliche Ratten (Wistar II) mit einem Körpergewicht von 140 - 190 g erhielten Altromin Standardnahrung und Wasser ad libitum. Lebern dieser Tiere wurden nach (87, 9, 10, 11) perfundiert. Die Narkose erfolgte mit Nembutal i. p. (0.1 ml/100 g Körpergewicht), i. v. Gabe von Heparin (Liquemin 1000 IE/kg Körpergewicht) verhinderte die Blutgerinnung. Die Operation dauerte 6 - 7 Minuten. Die Leber wurde dann mit Flußraten von $3.5 - 4.0 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$ über die v. portae durchströmt. Der venöse Abfluß erfolgte über die v. cava inf.,. Die Leber zeigte eine einheitliche gelbbraune Färbung (Cytochrome). Das Perfusat wurde nicht rezirkuliert (offenes System).

Die verwendeten Perfusionsmedien sind in Tabelle 1 aufgeführt (12). Wenn keine anderen Angaben gemacht werden, ist Bikarbonat der verwendete Puffer.

Tabelle 1

Zusammensetzung der verwendeten Perfusionsmedien

		Puffersystem		
		Bicarbonat (Standardmedium)	HEPES	DMO
NaCl	(mM)	115	136	115
KCl	(mM)	5.9	5.9	5.9
MgCl ₂	(mM)	1.2	1.2	1.2
NaH ₂ PO ₄	(mM)	1.2	1.2	1.2
Na ₂ SO ₄	(mM)	1.2	1.2	1.2
CaCl ₂	(mM)	2.5	2.5	2.5
NaHCO ₃	(mM)	25	---	---
Hepes	(mM)	---	4.6	---
DMO	(mM)	---	---	26
Begasung		O ₂ /CO ₂ (95/5, v/v)	100 % O ₂	100 % O ₂

Der pH wurde im Fall von HEPES auf 7.55 - 7.6, im Fall von DMO auf 7.5 eingestellt. Die Zugabe von L-Laktat und Pyruvat als Natriumsalze ergab - falls keine anderen Angaben gemacht werden - im Perfusat eine Konzentration von je 0.3 mM.

Das Perfusionsmedium wurde im Fall von Bikarbonatpuffer mit einem O_2/CO_2 -Gemisch (95/5, v/v), bei Verwendung CO_2 -freier Puffer mit 100 % O_2 äquilibriert. Anoxie wurde durch Ersatz von O_2 durch N_2 erreicht. Der in den anfänglichen Experimenten verwendete Scheiben-oxygenator wurde später durch einen Siliconschlauchoxygenator (entwickelt von Prof. R. Scholz) mit den Vorteilen besserer Handlichkeit und kleineren Totvolumens ersetzt. Die Temperatur an der Leberoberfläche betrug $37^{\circ}C$. Bei einem Teil der Versuche lag sie bei $33^{\circ}C$ - darauf ist an entsprechenden Stellen hingewiesen. Mikropumpen erlaubten kontinuierliche Infusion von auf pH 7.2 - 7.5 neutralisierten Substanzen in stufenweise veränderlicher Menge.

2.2. Organspektrophotometrie

Das von uns verwendete Geräte wurde von Dr. H. Schwab (Elektronikabteilung des Sonderforschungsbereiches Medizinische Molekularbiologie und Biochemie) ausgehend von den Erfahrungen Brauser (13) am Rapiidspektroskop entwickelt. Das Licht einer 150 W Xenonlampe wurde durch ein optisches Gitter spektral aufgespalten, mit Hilfe einer mit der Frequenz von 120 Hz rotierenden Scheibe - ähnlich der Methode nach Chance (14) - abwechselnd in Licht von 350 nm und 377 nm zerhackt und nach Leberpassage (Absorption) über ein UG2 Schutzfilter (2 mm Dicke) einem EM/9601 B Photomultiplier über Lichtleiter zugeführt - ebenso wie das in einem 45° Winkel zum erregenden Lichtstrahl entstehende Fluoreszenzlicht nach Passieren eines Schott GG 400 Filters (Dicke 2 mm) von einem RCA 1P21 Photomultiplier aufgenommen wird. Als extrazelluläre Fluoreszenz- und Absorptionsstandard diente dansyliertes Rinderserumalbumin, das nach der Methode von Bücher et al. (9) hergestellt wurde. Nähere Einzelheiten siehe (10).

2.3. Analysen

2.3.1. Extraktbereitung

Zur Bestimmung der Metabolitspiegel und der Aktivität der Pyruvat-dehydrogenase wurden Gewebsmengen von 300 - 600 mg mit einer vorgekühlten Aluminiumzange schnell in flüssigem Stickstoff gefroren. Von dem gefrorenen Gewebe wurde nach Mörsern und Abwiegen ein saurer Extrakt hergestellt (9).

Nach Zugabe der 5fachen Menge 0.6n Perchlorsäure wurde das Gemisch langsam während Ultrabeschallung aufgetaut. Nach Zentrifugation (10000 g, 10 min) wurde der Überstand mit 2n K_2CO_3 auf pH 4 - 6.5 gebracht. Das pro Gramm Gewebe erhaltene Extraktvolumen beträgt dann:

$$\frac{(C + B) \times E}{D \times A} \quad (\text{ml/g})$$

mit A: Gewebseinwaage (g)

B: Gewebswasser (ml), es wurde immer als 80 % von A angenommen

C: zugefügte Perchlorsäure (ml)

D: Überstand nach Zentrifugation (ml)

E: durch Zugabe von 2n K_2CO_3 auf pH 4 - 6.5 gebrachter Überstand (ml)

2.3.2. Präparation des Mitochondrienhomogenats (15)

Nach Dekapitieren der Ratte und raschem Heraustrennen der Leber wurde diese im Eisbad gewogen, in Stücke geschnitten und zweimal mit Sucroselösung (250 mM Sucrose, 2 mM Na-EDTA, 10 mM Tri-äthanolamin-HCl pH 7.2) gewaschen. Nach Zugabe der fünffachen Menge oben genannter Sucroselösung und nach Pottern (6 x) wird das Homogenat zentrifugiert (1000 g, 8 min). Der Überstand wird zentrifugiert (9000 g, 10 min). Das so erhaltene Sediment wird

mit 20 ml Sucrosepuffer versetzt und gepottert. Erneute Zentrifugation (12000 g, 10 min) liefert im Sediment die Mitochondrienfraktion, die in 1 ml Sucrosepuffer suspendiert wird. Sie wurde pro ml mit 5 mg Digitonin versetzt und 30 sec mit Ultraschall beschallt. Bei einer ähnlichen Behandlung fanden andere Untersucher 75 % der Glutamatdehydrogenasegesamtaktivität im löslichen Überstand (16). Nach 20 - 80 Minuten wurden dann die Inkubationen zur Bestimmung der Glutaminaseaktivität vorgenommen.

2.3.3. Metabolitanalysen

Da in den Perfusaten keine störenden Enzymaktivitäten zu finden waren, wurden diese nicht enteiweißt. Die Metabolitanalysen waren optische Tests in Anlehnung an die in (17) angegebenen. Während die photometrischen Tests bei Zimmertemperatur durchgeführt wurden, fanden fluorimetrische Messungen bei 25⁰ C in der temperierten Küvette statt.

Folgende Metabolite wurden halbautomatisch getestet. Die Extinktion vor Start der Reaktion lieferte ein Referenzgemisch in gleicher Zusammensetzung wie das Testgemisch, nur daß die zu testende Substanz fehlte.

1. Pyruvat

500 µl 0.1 M TRA pH 7.6, 0.2 mM NADH,
2 Einheiten Laktatdehydrogenase (Schweinemuskel)

100 µl Perfusat

2. Laktat

500 µl 0.5 M Glycin, 0.4 mM Hydrazinhydrat pH 9.1
1.5 mM NAD, 3 Einheiten Laktatdehydrogenase (Schweinemuskel)

100 µl Perfusat

3. Acetoacetat

500 µl 0.1 M TRA pH 7.6, 0.2 mM NADH
 5×10^{-3} Einheiten Hydroxybutyratdehydrogenase (Rhodopseudomonas spheroides)

100 µl Perfusat

4. β -Hydroxybutyrat 500 μ l 0.1 mM TRIS, 0.4 M Hydrazinhydrat
pH 8.5
1.5 mM NAD, 5×10^{-3} Einheiten
Hydroxybutyratdehydrogenase (Rhodospseudomonas spheroides)
100 μ l Perfusat

5. Glucose 500 μ l 0.1 M TRA pH 7.6, 0.4 mM NADP,
0.5 mM ATP
10 mM $MgCl_2$, 7 Einheiten Glucose-
6-Phosphatdehydrogenase (Hefe), 35
Einheiten Hexokinase (Hefe)
100 μ l Perfusat

6. Ammoniumionen 1000 μ l 66 mM TRIS pH 8.0, 1.5 mM α -
und Harnstoff Ketoglutarat,
nach (18) 0.5 mM ADP, 0.3 mM NADH, 0.2 mM
EDTA-Na
4 Einheiten Glutamatdehydrogenase
(Schweinemuskel)
100 μ l Perfusat

Nach Ablauf dieser Reaktion wurde mit

10 μ l Urease, 2 Einheiten (Schwertbohnen)
nachgestartet.

Mit folgenden Ansätzen wurden in der Einzelküvette Metabolitkonzentrationen im Extrakt oder im Perfusat gemessen. Der Start der Reaktion erfolgte in jedem Fall mit der Enzymzugabe.

1. α -Ketoglutarat (17) 500 μ l 0.1 M TRA pH 7.6
100 μ l Probe
10 μ l 0.5 M Ammoniumchlorid
5 μ l 6 mM NADH
5 μ l Glutamatdehydrogenase (6 Einheiten,
Schweinemuskel)

2. Glutamat (17)

400 μ l 0.5 M Glycin, 0.4 M Hydrazinhydrat
pH 9
100 μ l Probe
50 μ l 40 mM NAD
10 μ l Glutamatdehydrogenase (12 Einheiten,
Schweinemuskel)

3. Glutamin (17)

Nach einer zweistündigen Vorinkubation:
 200 µl 0.33 M Acetatpuffer pH 5
 200 µl Probe
 20 µl Glutaminase (0.3 Einheiten, E.coli)
 schloß sich obiger Glutamattest an.

4. Alanin (17)

500 µl 0.2 M Glycin, 0.2 M Hydrazinhydrat
pH 9.4

100 µl Probe

20 µl 75 mM NAD

10 µl Alanindehydrogenase (1.5 Einheiten,
Bacterium subtilis)

5. ATP (19)

400 μ l 50 mM TRA, 50 mM MgCl_2 , 5 mM
EDTA-Na pH 7.4

100 μ l Probe

50 μ l 10 mM Glucose

50 μ l 6.5 mM NADP

10 μ l Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
(1.75 Einheiten, Hefe)

Nach Ablauf dieser Reaktion erfolgt der eigentliche Start mit
10 μ l Hexokinase (0.3 Einheiten, Hefe)

6. ADP, AMP (19)

400 μ l 50 mM TRA, 50 mM MgCl_2 , 5 mM
EDTA-Na pH 7.4

100 μ l Probe

10 μ l 5 mM Phosphoenolpyruvat

20 μ l 1.4 mM NADH

10 μ l Laktatdehydrogenase (5,5 Einheiten,
Schweinemuskel)

10 μ l Pyruvatkinase (0.4 Einheiten, Kaninchenmuskel)

Nach Ablauf dieses Tests, in dem ADP bestimmt wird, läßt sich AMP messen durch Zugabe von

10 μ l Myokinase (0.7 Einheiten, Kaninchenmuskel)

7. Protein (17)

500 μ l 0.2n NaOH, 160 mM K-Na-Tartrat,
20 mM CuSO₄, 30 mM KJ
300 μ l H₂O
200 μ l Probe

Anhand einer mit Rinderserumalbumin erstellten Eichkurve läßt sich aus der erhaltenen Extinktionsänderung bei 546 nm die Proteinkonzentration ermitteln.

Wegen ihrer geringen Konzentration im Extrakt wurden folgende Metabolite fluorimetrisch gemessen (9, 19, 20):

1. NAD (19)

1500 µl 66 mM As_2O_3 , 33 mM Hydrazinhydrat
pH 9.6
10 µl Probe
10 µl absoluter Äthanol
10 µl Alkoholdehydrogenase (4 Einheiten,
Hefe)

Nach Ablauf der Reaktion wurden als Standard zugegeben:

10 μ l NAD, etwa 100 μ M

2. NADP (19)

1500 μ l 50 mM TRA, 50 mM MgCl_2 , 5 mM
EDTA-Na pH 7.4
50 μ l Probe
10 μ l Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
(0.9 Einheiten, Hefe)

Nach Ablauf der Reaktion wurden als Standard zugegeben:

10 μ l NADP, etwa 100 μ M

3. Glucose-6-Phosphat (19)

1500 μ l 50 mM TRA, 50 mM MgCl_2 , 5 mM
EDTA-Na pH 7.4
50 μ l Probe
10 μ l 6 mM NADP
10 μ l Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
(0.9 Einheiten, Hefe)

Nach Ablauf der Reaktion wurden als Standard zugegeben:

10 μ l Glucose-6-Phosphat, etwa 100 μ M

4. Coenzym A (17)

1000 µl 0.1 M NaAsO₄ pH 7.2
100 µl Extrakt, dem bereits während der Extraktbereitung Dithioerythrit (1 mM im Extrakt) zugesetzt wurde.
100 µl 27 mM NAD
10 µl 0.1 mM Dithioerythrit

10 μ l 0.1 M α -Ketoglutarat
5 μ l α -Ketoglutaratdehydrogenase
(Schweineherz)

Nach Ablauf der Reaktion wurden als Standard zugegeben:

10 μ l Acetyl-CoA, etwa 200 μ M

Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte bei den fluorimetrischen Tests über direkten Vergleich der Fluoreszenzänderungen von Standard und Probe. Die Konzentration des Standards wurde photometrisch ermittelt. Die Berechnung der photometrischen Tests erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz unter Zugrundelegung von Extinktionskoeffizienten von $6.22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 340 nm, von $3.3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 365 nm. Die in den Testvorschriften angegebenen Enzymaktivitäten wurden nicht gemessen, sondern nach den Angaben der Herstellerfirmen berechnet.

2.3.4. Bestimmung der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase im Gewebe

Etwa 50 mg gefriergestopptes Gewebe wurde in 0.5 ml 5 mM TRIS (mit 0.2 % Lubrol und 1 % Rattenserum) pH 7.0 plus 3 ml Siliconöl (Dichte 0.95, lot AK 20 von Wacker-Chemie, Burghausen) homogenisiert. Näheres siehe (11). Anschließend wurde zentrifugiert, (10000 g, 2 min). Dieses Vorgehen stellt eine Modifizierung der Methode dar, die bei Fettgewebshomogenaten angewendet wird (21).

Die Aktivitätsbestimmung der Pyruvatdehydrogenase wurde in den Extrakten wie in (21, 5) beschrieben, durchgeführt. Die Gesamtaktivität der Pyruvathydrogenase wurde nach Inkubation mit 10 mM MgCl_2 und teilweise gereinigter Pyruvatdehydrogenase Phosphatase aus Schweineherz erhalten (21). Die Aktivitätsbestimmungen wurden bei 25°C durchgeführt.

2.3.5. Bestimmung der Aktivität der Glutaminase im Mitochondrienhomogenat

Die angegebene Methode stellt eine Modifizierung der in (22) angegebenen dar. Zu 1 ml Inkubationspuffer (50 mM TRIS pH 8.6, 1 mM KCN, 0.2 mM EDTA-Na, 0.2 mM Aminooxyacetat) wurden 50 µg Rotenon, 200 µl digitoninhaltiges Mitochondrienhomogenat, und 100 µl Ammoniumchlorid (0 - 80 mM) zugefügt. Die Inkubation wurde durch Zugabe des Mitochondrienhomogenats gestartet und bei 25°C unter Stickstoffbegasung durchgeführt. In definierten Zeitabständen wurden Proben entnommen, sofort enteiweißt und auf Glutamat getestet. Von den einzelnen Inkubationen wurden Proben auf ihren Proteingehalt untersucht.

2.3.6. $^{14}\text{CO}_2$ Produktion aus ^{14}C -markierten Substanzen

Das Perfusionsmedium enthielt im Liter 2.5 µCi $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat oder 5 - 8 µCi U- ^{14}C -Glutamin. Das venöse Perfusat wurde über je 2 Minutenzeiträume gesammelt. Die Fixierung des durch Ansäuern freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$ geschah mit Phenyläthylamin. Die Radioaktivität wurde durch Seintillationsspektrometrie gemessen (23, 24). Die Berechnung erfolgte auf der Basis der spezifischen Aktivität im Perfusat.

2.4. Verwendete Reagenzien und Geräte

Pyruvatdehydrogenase Phosphatase aus Schweineherz wurde freundlicherweise von Dr. E. Siess, α -Ketoglutaratdehydrogenase freundlicherweise von Dr. H. Kolb, beide Forschergruppe Diabetes, München, zur Verfügung gestellt. Glutaminase (Reinheitsgrad V) und L-Glutamin stammten von Sigma Chem. Co., St. Louis. Alle anderen Enzyme, DL- β -Hydroxybutyrat und Pyruvat, beide als Natriumsalz, waren von Boehringer, Mannheim. Natriumacetoacetat wurde durch Hydrolyse von Acetessigsäuremethylester (Merck, Darmstadt) und nachfolgendes Entfernen von Methanol, hergestellt. Hydrazinhydrat und

L-Milchsäure waren von Roth, Karlsruhe. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat war von Buchler, Braunschweig. Hepes war von Serva, Heidelberg, und DMO von Schuchardt, München. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose, $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Glutamin waren von New England Nuclear. t-Butylhydroperoxid wurde freundlicherweise von der Fa. Peroxid Chemie, München, zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Reagenzien stammten von Merck, Darmstadt.

Photometrische Tests wurden mit einem Hitachi UV-VIS Spectrophotometer oder einem Photometer Eppendorf, fluorimetrische Tests mit einem Photometer Eppendorf mit Fluoreszenzzusatz (Primärfilter 365 nm, Sekundärfilter > 405 nm) durchgeführt. Kontinuierliche Messung der Sauerstoffkonzentration und des pH im venösen Perfusat erfolgte mit einer Clark-Platinelektrode und einer Glaselektrode. Zur Registrierung dienten Servogor S Kompensationsschreiber RE 541.

3. ERGEBNISSE

3.1. Metabolische Effekte bei Infusion von Ammoniumchlorid

3.1.1. Übersicht über den Stoffwechsel von Ammoniumionen

In Tabelle 2 sind einige Eigenschaften der in Abb. 1 genannten Enzyme aus der Rattenleber aufgeführt. Diese Werte geben jedoch nicht die aktuelle Enzymaktivität in der perfundierten Rattenleber wider, da die Aktivitätsbestimmung der Enzyme in vitro möglicherweise nicht in vivo Bedingungen erfaßt. Außerdem können nutritive (33) und hormonelle (34) Faktoren den Enzymgehalt beeinflussen. Weiterhin können die Konzentrationen von Enzymaktivatoren und -inhibitoren in der Zelle Schwankungen unterliegen. So wird zum Beispiel die Glutaminsynthetase durch α -Ketoglutarat aktiviert (35), durch Carbamylphosphat gehemmt (35), die K_m -Werte der Glutamatdehydrogenase für ihre Substrate werden durch Leucin erhöht (29), und die Aktivität der Glutaminase durch Acyl-CoA beeinflußt (36, 37). Es läßt sich aber aus Tabelle 2 entnehmen, daß die Asparaginasereaktion:



quantitativ wenig zur Ammoniumionenbildung beitragen kann. Die Bedeutung der AMP Deaminase als Ammoniumionenlieferant ist für die Rattenleber noch unsicher, für den Rattenmuskel jedoch nachgewiesen (38). Sie wurde aber kürzlich als Ammoniumionenhauptlieferant aus Aminosäuren in der Rattenleber diskutiert (39). Die im Muskel durch die Reaktion



freiwerdenden Ammoniumionen werden zur Leber transportiert, um dort fixiert zu werden.

Die Glutamin-Ketosäuretransaminase katalysiert die Reaktion



Tabelle 2. Einige Eigenschaften NH_4^+ fixierender und NH_4^+ freisetzender Enzyme aus der Ratte Leber. Die Aktivitätsbestimmungen fanden bei 25°C statt. Die Aktivitäten sind angegeben in $\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber frisch})^{-1}$.

Enzym	Aktivität $\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$	Substrat	$K_M(\text{Substrat})$ mM	Substratgehalt $\mu\text{Mol} \times (\text{g Leber})^{-1}$
Glutamatdehydrogenase	118	NH_4^+ α -Ketoglutarat	11.9 (29) 0.15 (29)	0.47 (31) 0.145 (31)
		NADPH	0.026 (29)	0.341 (86)
		NADH	0.047 (29)	0.105 (86)
Glutaminase	5.78 (25)	Glutamin	70 - 100 ² (27)	3.54 - 5.03 (17)
AMP				
Deaminase	0.88 (25)	AMP	-	0.13 (32)
Asparaginase	0.02 - 0.5 (25)	Asparagin	2.2 ¹ (27)	-
Glutaminsynthetase	4.4 (25)	Glutamat NH_4^+ ATP	3 (28) 0.2 (28) 0.8 (28)	2.41 (31) 0.47 (31) 2.28 (87)
Carbamylphosphatsynthetase	5.63 (25)	ATP HCO_3^- NH_4^+	0.5 - 3 (30) 4 - 5 (30) 1 - 2 (30)	2.28 (87) - - 0.47 (31)
Glutaminsäuretransaminase + w-Oxidase	0.37 (25)	Ketosäure Glutamin	- -	3.54 - 5.03 (17)

¹Wert für Meerschweinchen Serum asparaginase

²Messung bei 37°C

Reaktion (II) wird durch die ω -Oxidase katalysiert. Reagiert α -Ketoglutarat, dann gleicht die Summengleichung obiger Reaktion der Umsetzung an der Glutaminase



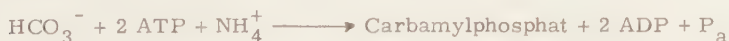
Die Bedeutung der Ketosäuren-Glutamintransaminase ist in der Rattenleber fraglich. Katunuma et al. (40) fanden in der Rattenleber etwa gleiche Aktivitäten von Glutaminase und Glutamin-Ketosäuretransaminase. Allerdings diente hier α -Ketoglutarat beziehungsweise Pyruvat in der unphysiologischen Konzentration von 40 mM als Substrat für die Glutamin-Ketosäuretransaminase. Die Glutaminsynthetase-Reaktion



scheint trotz genügend hoher Aktivität für die Ammoniumionenelimination nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da, wie in 3.1.2.3. berichtet, auch in Gegenwart von 5 mM Ammoniumionen nur ein geringer Anstieg der Glutaminkonzentration im Perfusat zu finden ist.

Somit stehen den im Zellstoffwechsel anfallenden Ammoniumionen noch zwei Hauptreaktionswege offen; die Reaktion an der Glutamatdehydrogenase und an der Carbamylphosphatsynthetase. Obwohl die in der Mitochondrienmatrix lokalisierte Glutamatdehydrogenase (41) in vitro sowohl mit NADH als auch mit NADPH reagiert, dürfte in der perfundierten Leber NADPH der Hauptreaktionspartner sein (10, 42, 43, siehe auch 3.2.4.). Dieses Ergebnis wird auch unterstützt durch Messungen von Chamalaun und Tager (44) am geschlossenen System.

Die Reaktion



wird von der Carbamylphosphatsynthetase katalysiert. Im Gegensatz zum weniger aktiven zytosolischen Enzym, das Carbamylphosphat für die Synthese der Purine und Pyrimidine liefert, benötigt das mitochondriale Matrixenzym N-Acetylglutamat als Aktivator (45). Das in den Mitochondrien entstandene Carbamylphosphat reagiert mit Ornithin (46, 47, 48). Wie aus Abb. 2 ersichtlich, stammt eine der beiden Amino-

gruppen des Harnstoffs aus Carbamylphosphat, die andere aus Aspartat.

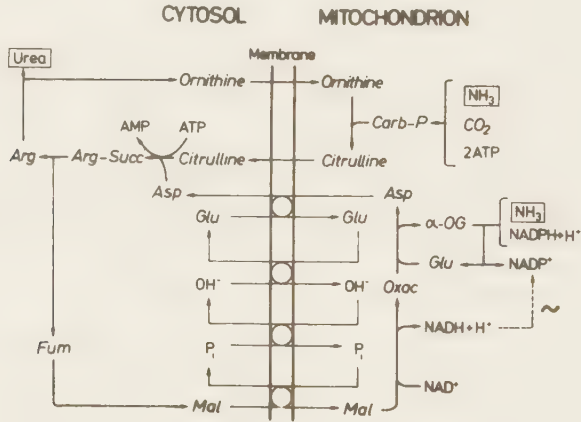


Abb. 2 Übersicht über die zur Harnstoffproduktion aus Ammoniak nötigen Reaktionen und Metabolitschritte.

Arg = Arginin, Arg-Succ = Argininosuccinat, Asp = Aspartat, Carb-P = Carbamylphosphat, Fum = Fumarat, Glu = Glutamat, Mal = Malat, $\alpha\text{-OG}$ = α -Ketoglutarat, Oxac = Oxalacetat, P_i = anorganisches Phosphat, Urea=Harnstoff.

Dieses wird im Gegentauch mit Glutamat aus dem Mitochondrium transportiert (49). LaNoue konnte kürzlich zeigen, daß dieser Transport elektrogen ist (50), das heißt, daß die Substratbindungsstellen des Transportsystems eine Spezifität für bestimmte Anionen bestimmter Ladung auf beiden Seiten der Membran hat. Bei den in Abb. 2 gezeigten Metabolitverschiebungen resultiert insgesamt ein Austausch von Aspartat und Malat. Für Glutamat sind zwei verschiedene Transportsysteme beteiligt. Das eine, von Azzi beschriebene (49), bringt den Glutamateintransport in das Mitochondrion durch gleichzeitigen Aspartataustransport zustande. Zur Aufrechterhaltung dieses Transports ist immer eine bestimmte Glutamatkonzentration extramitochon-

drial nötig. Glutamat wird durch das zweite System - beschrieben von Meijer et al. (51) - aus den Mitochondrien im Gegentausch mit Hydroxylionen transportiert. Für die Elektroneutralität bei letzterer Rückverschiebung sorgt ein Gegentausch mit Phosphat, das wiederum an einem Transportsystem für Dikarbonsäuren (Malat) beteiligt ist.

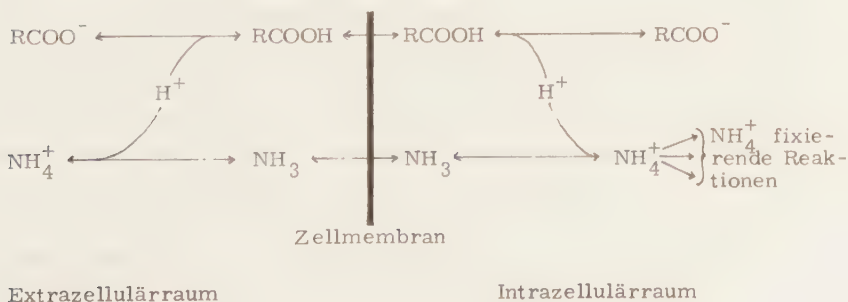
Dieser Malat-Aspartat-Shuttle ist einer der bedeutenden Wege für das Einschleusen von im Zytosol entstandenem NADH in die Mitochondrien (52).

3.1.2. Stoffwechsel von Ammoniumionen in der perfundierten Rattenleber

3.1.2.1. Veränderungen im pH bei Infusion von Ammoniumchlorid

Die passive Permeation von Metaboliten durch biologische Membranen geschieht in Form der ungeladenen Teilchen, da diese im Vergleich zu Ladungsträgern eine hohe Löslichkeit in der hydrophoben Phase der Membranen besitzen (53, 54). Trotz des hohen pK von 9.02 (35) permeiert der Ammoniak unter physiologischen pH Bedingungen als solcher und nicht als Ammoniumion. Daraus resultiert nach Abb. 3, daß bei einem Nettoeintransport von Ammoniak in die Zelle der Extrazellulärraum azidifiziert wird.

Abb. 3 Schema der Permeation von Ammoniak und Monocarboxylaten durch biologische Membranen



Dies wird durch das Experiment in Abb. 4 belegt. Der analoge Effekt wird bei Äquilibrierung von Monocarboxylatgradienten beobachtet, wobei der Extrazellulärraum alkalisiert wird. Das entstehende Diffusionsgleichgewicht wird durch die Donnanbeziehung bestimmt.

$$\frac{[H^+]_i}{[H^+]_e} = \frac{f_{1e} \times [RCOO^-]_e}{f_{1i} \times [RCOO^-]_i} = \frac{f_{2i} \times [NH_4^+]_i}{f_{2e} \times [NH_4^+]_e}$$

wobei f_1 bzw. f_2 der Aktivitätskoeffizient der Base ist und i und e, intra- und extrazellulär bedeuten.

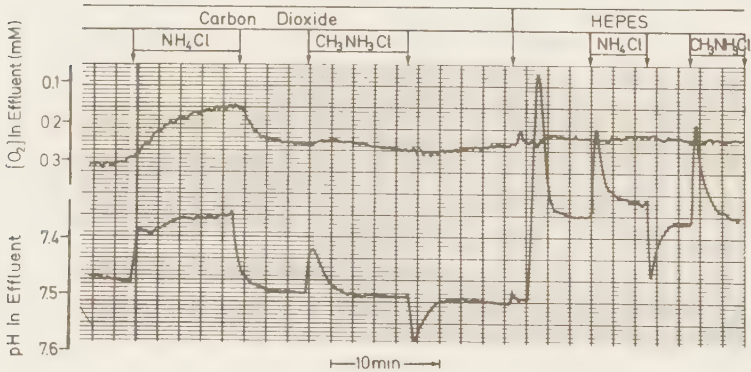


Abb. 4 Sauerstoffkonzentration (obere Kurve) und pH (untere Kurve) im ausströmenden Perfusat der perfundierten Rattenleber. Infusion von NH_4Cl (1.5 mM) führt bei Verwendung von Bikarbonatpuffer zu einer Mehratmung. Sie tritt nicht auf bei Ersatz des Bikarbonatpuffers durch HEPES. Die pH-Veränderungen spiegeln den Transportmechanismus von NH_4Cl bzw. CH_3NH_3Cl (4.1 mM) über die Zellmembran wider. In HEPES verhält sich NH_4Cl wie CH_3NH_3Cl wegen der fehlenden Nettoaufnahme im stationären Zustand.

Die aus dem Ammoniaketransport resultierende anfängliche Perfusatsäuerung hält somit nur solange an, bis die Äquilibration zwischen Lebergewebe und Perfusat vollzogen ist; dann sollte der ursprüngliche pH im Perfusat wieder erreicht sein. Das Beibehalten eines tieferen pH Plateaus liegt in der Stoffwechselaktivität (Nettoaufnahme) des Ammoniaks begründet. Der Effekt fehlt hingegen bei Methylammoniumchlorid, das sich metabolisch inert verhält. Durch die Veränderungen im pH während Ammoniumioneninfusion ändert sich auch die Verteilung anderer Monocarboxylate. Dies zeigt Abb. 5. Benzoat wird wegen seiner vernachlässigbaren Beteiligung am Stoffwechsel als Indikatormonocarboxylat betrachtet (54).

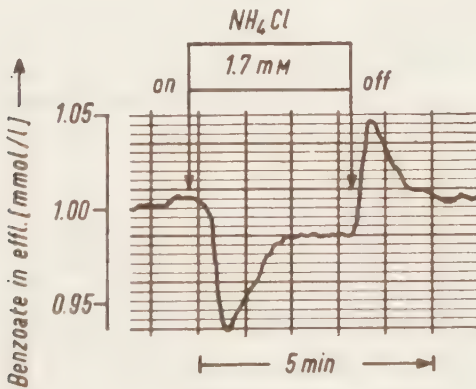


Abb. 5 Benzoatkonzentration im ausfließenden Perfusat einer perfundierten Rattenleber während Infusion von NH_4Cl . Die intrazelluläre Alkalisierung durch NH_4Cl Gabe (1.7 mM) bedingt eine Benzoataufnahme durch die Leber. Die arterielle Konzentration von Benzoat betrug 1 mM. Die Benzoatkonzentration wurde photometrisch in der Durchflußküvette bei 273 nm registriert. Temperatur: 33° C.

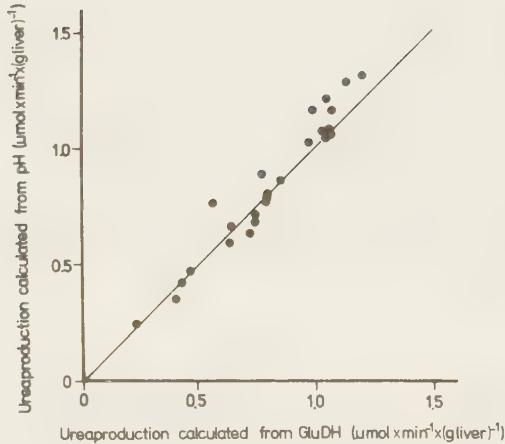


Abb. 6 Vergleich zwischen enzymatisch nach (18) ermittelter und aus der pH-Änderung berechneter Harnstoffproduktion. Da aus dem durch die Leber aufgenommenen NH_4Cl zu über 90 % Harnstoff gebildet wird, läßt sich aus den im Extrazellulärraum zurückgebliebenen H^+ die Harnstoffproduktion abschätzen. ΔH^+ wurde aus den pH-Änderungen im austretenden Perfusat berechnet nach Eichung durch Infusion von titrierbarer HCl oder NaOH. Die Punkte stammen von 8 Lebern, die mit $[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}] = 0.3 \text{ mM}/0.3 \text{ mM}$ und drei Lebern, die mit $[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}] = 3.0 \text{ mM}/0.3 \text{ mM}$ perfundiert wurden. Die Punkte entsprechen stationären Harnstoffproduktionsraten.

Aus der Differenz der pH-Werte im stationären Zustand kann man die Nettoaufnahme von Ammoniak erfassen. Wie unten gezeigt wird (3.1.2.3.), entsteht aus dem netto aufgenommenen Ammoniak zu über 90 % Harnstoff. Man kann daher aus den im Extrazellulärraum verbleibenden H^+ Ionen die Harnstoffproduktion abschätzen, jedoch nur näherungsweise, da es nicht sicher ist, ob der durch Ammoniumionen veränderte Zellstoffwechsel sekundär die pH Differenz über die Zellmembran beeinflusst. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da Infusion von Ammoniumionen bei HEPES-gepufferter Perfusion in der pH Registrierung im Perfusat Effekte zeigt, die denen bei Methylammoniumchloridgabe sehr ähnlich sind (siehe Abb. 4). Wie weiter unten erörtert wird, ist bei Verwendung CO_2 freier Puffersysteme die Bildung von Harnstoff völlig gehemmt, während der übrige Stoffwechsel kaum verändert ist. Abb. 6 zeigt einen Vergleich zwischen enzymatisch gemessener und aus der pH Registrierung ermittelter Harnstoffproduktion. Die auf beiden Wegen erhaltenen Ergebnisse stimmen gut überein.

3.1.2.2. Harnstoffproduktion und Sauerstoffaufnahme

Die obere Kurve in Abb. 4 zeigt den Anstieg der Sauerstoffaufnahme während Infusion von 1.5 mM Ammoniumchlorid. Dieser Sauerstoffmehrverbrauch spiegelt den zusätzlichen Energieverbrauch durch die Harnstoffbildung wider, wenn man annimmt, daß die übrigen energieverbrauchenden Prozesse unverändert bleiben. Pro Mol gebildeten Harnstoff werden 4 Mol energiereiches Phosphat verbraucht (vgl. Abb. 2): 2 Mol intramitochondrial bei der Carbamylphosphatsynthese und 2 Mol extramitochondrial bei der Argininosuccinatbildung. Der Energieverbrauch für den Aspartataustransport (≤ 1 Mol ATP/Mol Aspartat) bleibt dabei unberücksichtigt. Abb. 7 zeigt, daß die Harnstoffproduktion durch die Leber bei einer Temperatur von $37^\circ C$ einen Maximalwert von etwa $1.1 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$ bereits ab einem Ammoniumchloridgebot von $6 - 7 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$, entsprechend 1.5 mM im eintretenden Perfusat, erreicht hat. Die halbmaximale Harnstoffbildungsrate liegt bei etwa $2.5 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$, beziehungsweise 0.6 mM Ammoniumchlorid im eintretenden Perfusat. Das leichte Absinken der Harnstoff-

produktion bei 5 mM Ammoniumchlorid stimmt mit dem von Chamalaun und Tager am geschlossenen System gemessenen Wert von $0.9 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$ Harnstoff überein, wenn 10 - 13 mM Ammoniumchlorid gegeben wurden (44). Wie aus Abb. 7 zu ersehen, ist die Harnstoffproduktion unabhängig vom arteriellen Laktat/Pyruvat im Bereich von 1 bis 10. Während Infusion von Äthanol, also bei höherem Laktat/Pyruvat, beobachteten Williamson et al. an isolierten Leberzellen bei Gabe von Ammoniumchlorid eine verringerte Harnstoffproduktion (56).

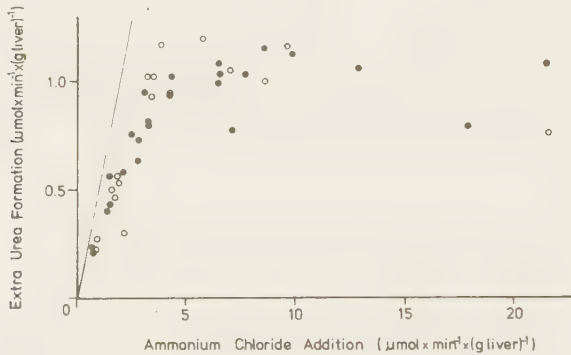


Abb. 7 Harnstoffmehrproduktion der perfundierten Rattenleber in Abhängigkeit von unterschiedlichem arteriellem NH_4Cl Angebot. Die Punkte entsprechen stationären Produktionsraten, wie sie nach etwa 7minütiger NH_4Cl Infusion erreicht werden. Die Gerade entspricht einer vollständigen Umwandlung des angebotenen NH_4Cl in Harnstoff. 1 mM NH_4Cl im arteriellen Perfusat entspricht einem NH_4Cl Angebot von etwa $4 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$. Die Punkte stammen von 6 Lebern, die mit $[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}] = 0.3 \text{ mM} / 0.3 \text{ mM}$ (●) und 4 Lebern, die mit $[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}] = 3.0 \text{ mM} / 0.3 \text{ mM}$ (○) perfundiert wurden.

Nach Abb. 2 müssen zur Bildung von $1.1 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$ Harnstoff $4.4 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$ energiereiches Phosphat bereitgestellt werden. Die eingezeichnete Gerade in Abb. 8 entspricht der theoretischen Sauerstoffmehraufnahme, berechnet unter Annahme eines $\text{P/O} = 3$. Bei einigen Experimenten wurde ein etwas niedrigerer Wert als der theoretisch erwartete beobachtet. Dies war besonders dann der Fall, wenn schon einige Ammoniakgaben vorausgegangen waren; dieser Unterschied wurde nicht weiter untersucht. Die Harnstoffproduktion geht einher mit einer Mehratmung, wie sie theoretisch zu erwarten ist.

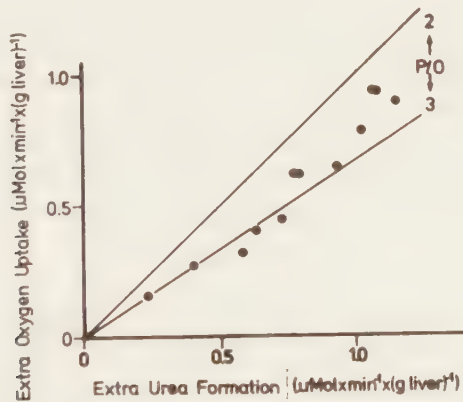


Abb. 8 Sauerstoffmehraufnahme der perfundierten Rattenleber in Abhängigkeit von der Harnstoffmehrproduktion aus NH_4Cl . Die beiden Geraden entsprechen einer theoretischen Mehratmung unter Annahme eines Verbrauchs von 4 ATP/Mol gebildeter Harnstoff und eines $\text{P/O} = 3$ bzw. 2, wobei der Energieverbrauch für den Aspartataustransport (50) unberücksichtigt blieb.

3.1.2.3. Aminosäureproduktion und Stickstoffbilanz

Durch die Reaktion von Ammoniumionen an der Glutamatdehydrogenase ist eine Zunahme von Glutamat und eine Abnahme von α -Ketoglutarat

gegeben. In Tabelle 3 sind die Gewebsgehalte dieser Metabolite aufgeführt. Ein deutlicher Abfall des α -Ketoglutaratgehalts und ein Anstieg des Glutamatgehalts sind bei den bei 33° C perfundierten Lebern erkenntlich. Bei 37° C Perfusionen sinkt ebenfalls der α -Ketoglutaratgehalt ab, während der Glutamatgehalt praktisch unverändert bleibt. Der Ersatz des Bikarbonatpuffers im Perfusat durch HEPES führt zu vergleichbaren Änderungen der Gewebsgehalte dieser Metabolite. Der letztere Puffer wird in 3.2. im Vergleich zu Bikarbonat bezüglich der Harnstoffsynthese diskutiert.

Tabelle 3 α -Ketoglutarat- und Glutamatgehalte der perfundierten Rattenleber (nMol/g perfundierte Leber) während Infusion verschiedener Konzentrationen von NH_4Cl bei einer Versuchstemperatur von 33° C und 37° C an der Leberoberfläche. Der Frierstop erfolgte 5 Minuten nach Anschalten der NH_4Cl Infusion. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ S.E.M., die Anzahl der Versuche ist in Klammern. Alle übrigen Ergebnisse sind Mittelwerte von 3 Versuchen.

Perfusionspuffer	NH_4Cl -Zugabe mM	α -Ketoglutaratgehalt nMol/g	Glutamatgehalt nMol/g	Versuchstemperatur °C
NaHCO_3 (25mM)	---	232 ± 21 (7)	812 ± 101 (6)	33° C
O_2/CO_2 , 95/5	0.35	157	---	
	0.7	90	---	
	1.4	63 ± 9 (6)	1269 ± 150 (6)	
NaHCO_3 (25mM)	---	381 ± 28 (5)	1153 ± 90 (4)	37° C
O_2/CO_2 , 95/5	1.4	199 ± 25 (4)	1174	
Hepes (4.6mM)	---	135 ± 18 (4)	1233	
100 % O_2	1.4	43 ± 7 (4)	1296 ± 133 (4)	

Durch Transaminierung (Glutamat-Oxalacetattransaminase, Glutamat-Pyruvattransaminase) und Amidierung (Glutaminsynthetase) können bei Gabe von Ammoniumchlorid Aminosäuren entstehen (Abb. 1). Die

Glutaminkonzentration im Perfusat steigt bei Infusion von 1.3 mM Ammoniumchlorid von etwa 20 μM auf ca. 60 μM an; dieser Anstieg ist reversibel (Abb. 9). Brosnan konnte am lebenden Tier nach i. p. Injektion von 2.5 mMol Ammoniumchlorid pro kg Körpergewicht zeigen, daß der Glutamingehalt der Rattenleber nur geringfügig ansteigt (57).

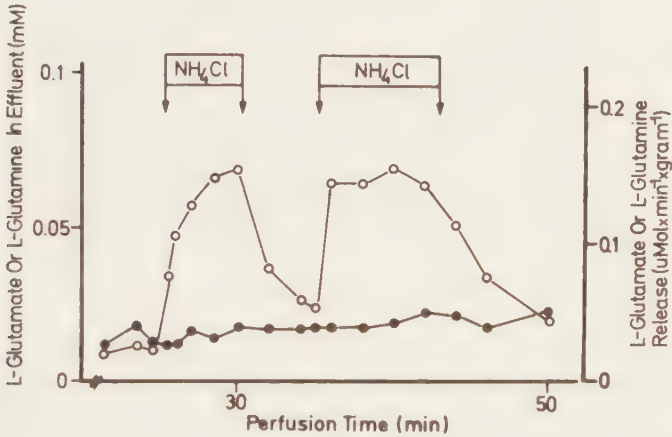


Abb. 9 Glutamat (●) und Glutaminkonzentration (o) im ausströmenden Perfusat der perfundierten Rattenleber während Infusion von NH_4Cl (1.5 mM). Die Leber wurde mit arteriell mit $[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}] = 3.0 \text{ mM} / 0.4 \text{ mM}$ durchströmt.

Es ist also möglich, daß alles zusätzlich gebildete Glutamin die Leberzelle verläßt. Tabelle 4 zeigt die Glutamat- und Glutaminproduktion bei HEPES- und bikarbonatgepufferter Perfusion in Abhängigkeit von der Ammoniumionenkonzentration im eintretenden Perfusat. Die Glutamatkonzentration im Perfusat bleibt praktisch unverändert.

Tabelle 4 Glutamat- und Glutaminabgabe der perfundierten Rattenleber in das Perfusat während Infusion verschiedener Konzentrationen von NH_4Cl . Die Perfusionen wurden bei 37°C und $[\text{Laktat}] = 4\text{ mM}$, $[\text{Pyruvat}] = 0.5\text{ mM}$ durchgeführt. Die Messungen erfolgten 5 - 10 Minuten nach Zusatz von NH_4Cl in das eintretende Perfusat.

	Bikarbonatpuffer		HEPES	
	nMol x min ⁻¹ x (g Leber) ⁻¹			
mM				
Ammoniumchlorid	Glutamat	Glutamin	Glutamat	Glutamin
---	48	45	30	66
0.18	53	39	30	135
0.36	--	--	36	218
0.9	55	123	36	220
1.8	52	101	33	230
5.4	48	101	27	210
10.4	48	75	33	200

Auch die Alaninmehrproduktion während Ammoniakgabe ist gering (Tab. 5).

Tabelle 5 Alaninproduktion der perfundierten Rattenleber. Die Messungen erfolgten nach 6minütiger Infusion von NH_4Cl .

mM	Alanin $\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$	
	Bikarbonatpuffer	HEPES
Ammoniumchlorid		
---	35	102
0.75	65	178
Arteriell:		
Laktat (mM)	0.6	0.9
Pyruvat(mM)	1.1	1.3

Mit 1.4 mM Ammoniumchlorid gelangen etwa 50 μM Aminosäuren zusätzlich in das Perfusat, also weniger als 5 % der infundierten Ammoniumionen erscheinen als Aminosäuren im Perfusat im stabilen Zustand, d. h. nach ca. 8 Minuten. Die restlichen 95 % finden sich als Harnstoff oder als freier Ammoniak wieder. Sowohl bei HEPES- wie bei bikarbonatgepufferter Perfusion betragen die Wiederfindungswerte als Ammoniak und Harnstoff immer zwischen 90 und 98 %. Dies bestätigt die niedrige gemessene Steigerung der Aminosäureproduktion während Infusion von Ammoniumchlorid im stabilen Zustand, d. h. 8 Minuten nach Infusionsbeginn. Der Stoffwechsel, der von der Leber aufgenommenen Ammoniumionen führt also zu über 90 % zu Harnstoff.

3.1.3. Begleitende Stoffwechseleffekte

In den Abbildungen 10 a und 10 b sind die Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat, Acetoacetat, Laktat und Pyruvat gegen die Zeit aufgetragen. Ammoniumchloridinfusion bedingt ein Absinken der β -Hydroxybutyratkonzentration, während die Konzentration von Acetoacetat um den gleichen Betrag ansteigt. Die Laktatkonzentration fällt in Abb. 10 b nur geringfügig während Ammoniumchloridinfusion ab; gleichzeitig ist auch ein besonders starkes Absinken der Pyruvatkonzentration gegeben.

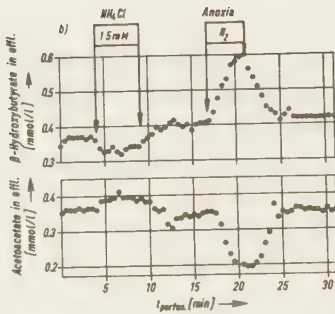


Abb. 10 a

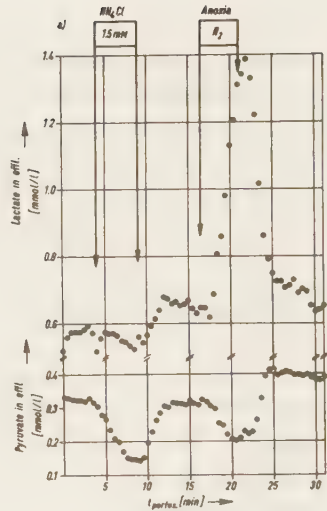


Abb. 10 b

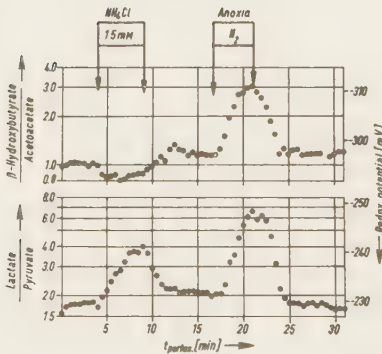


Abb. 10 c

Abb. 10 a) Konzentration von β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat im ausfließenden Perfusat der perfundierten Rattenleber während Infusion von NH_4Cl (1.5 . mM) und Anoxie . Die infundierten Konzentrationen betrugen $[\beta\text{-Hydroxybutyrat}] = 0.51 \text{ mM}$, $[\text{Acetoacetat}] = 0.26 \text{ mM}$, $[\text{Laktat}] = 0.46 \text{ mM}$, $[\text{Pyruvat}] = 0.54 \text{ mM}$. Temperatur: 33°C .

b) Konzentration von Laktat und Pyruvat im ausfließenden Perfusat der perfundierten Rattenleber des Experiments in Abb. 10 a).

c) Redoxquotienten Hydroxybutyrat/Acetoacetat (= B/A) und Laktat/Pyruvat (= L/P) im Perfusat des Experiments aus Abb. 10 a), b). Die zugehörigen Redoxpotentiale wurden unter Verwendung der entsprechenden Mittelpotentiale ($E_{\text{O B/A}} = -297 \text{ mV}$ und $E_{\text{O L/P}} = -215 \text{ mV}$) berechnet.

Da die Summe der Konzentrationen von Laktat und Pyruvat absinkt, scheidet die Aktivität der Laktatdehydrogenase als Erklärung der Verringerung der Pyruvatkonzentration aus. Die während Infusion von Ammoniumchlorid erhöhte Nettopyruvataufnahme durch die Leber ist also nicht durch einen Anstieg der Nettolaktatabgabe zu erklären. Außerdem ist eine Veränderung der Glykolyserate als Erklärung dieser gesteigerten Nettopyruvataufnahme nicht wahrscheinlich, da die Glucoseabgabe der Leber während Ammoniumchloridinfusion kaum absinkt. Dies ist der Fall bei Experimenten bei denen die Leber mit $[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}] = 0.3 \text{ mM} / 0.3 \text{ mM} = 1$ perfundiert wurde. Bei $[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}] = 6$ hingegen findet häufig sich nach anfänglichem Absinken eine Rückkehr der Glucoseabgabe zum Ausgangswert (Abb. 11 a)).

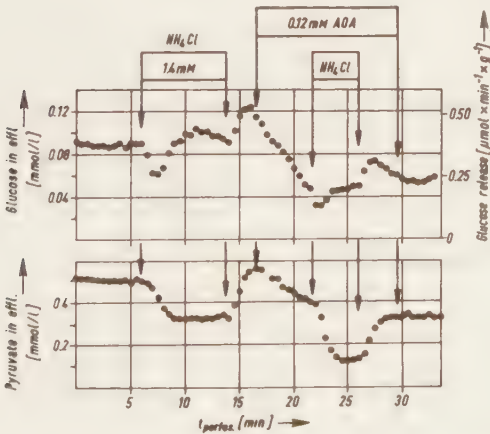


Abb. 11 a

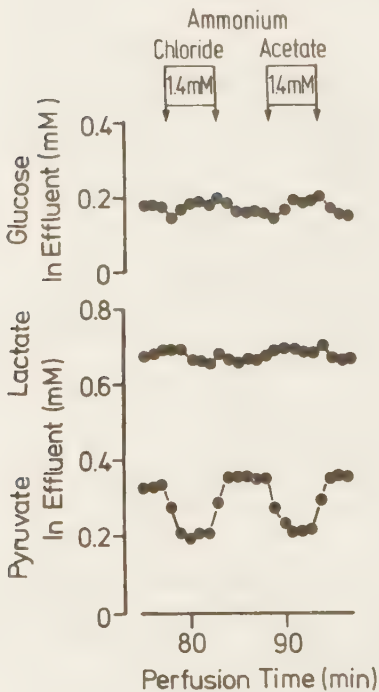
Abb. 11 b

- Abb. 11 a) Glucoseabgabe der perfundierten Rattenleber bei Infusion von NH_4Cl (1.4 mM) und Aminooxyessigsäure (0.2 mM). Die arterielle Laktatkonzentration betrug 3.3 mM, die arterielle Pyruvatkonzentration 0.5 mM. Temperatur: 33°C .
- b) Pyruvatkonzentration im ausfließenden Perfusat der perfundierten Rattenleber des Experiments von Abb. 11 a). Aminooxyessigsäure hat keinen Einfluß auf die Pyruvatmehr-aufnahme während Infusion von NH_4Cl .

Auch die Aminierung von Pyruvat kann nicht vollständig als Erklärung dienen, da die erhöhte Pyruvataufnahme durch die Leber während Ammoniumchloridinfusion nicht unterdrückt werden konnte durch Aminooxyessigsäure, den Hemmstoff der Transaminierungsreaktion (Abb. 11 b)). Eine Erklärung wird in 3.2. gegeben.

Zu Kontrollzwecken wurde Ammoniumchlorid gegen Ammoniumacetat ausgetauscht. Die beschriebenen Effekte (Harnstoffproduktion, Ammoniakaufnahme, Pyruvat-, Laktat- und Glucosekonzentration im ausfließenden Perfusat) bleiben dabei unbeeinflusst (Abb. 12).

Abb. 12



Glucose-, Laktat-, Pyruvatkonzentration im ausfließenden Perfusat der perfundierten Rattenleber bei Infusion von Ammoniumchlorid (1.4 mM) und Ammoniumacetat (1.4 mM). Ersatz von Ammoniumchlorid durch Ammoniumacetat bewirkt keinen Unterschied im Konzentrationsverlauf der Metabolite im Perfusat.

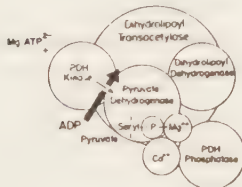
3.2. Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase

3.2.1. Kontrolle der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase

Der Pyruvatdehydrogenasekomplex (Abb. 13), der in der Mitochondrienmatrix lokalisiert ist, ist ein Multienzymkomplex. Die thiaminpyrophosphatabhängige Pyruvatdehydrogenase katalysiert die Dehydrogenierung von Pyruvat mit gleichzeitiger CO_2 Abspaltung. Sie ist ein Tetramer, bestehend aus zwei verschiedenen Proteinketten α und β , mit der Struktur $\alpha_2\beta_2$ (59). Unter Reduktion des Cofaktors Liponsäureamid wird in der nächsten Reaktion der aus Pyruvat entstandene aktivierte Acetaldehyd zur Säure oxidiert und auf das freie Coenzym A übertragen (Transacetylaserreaktion). Die oxidative Regeneration der Disulfidbrücke des Liponsäureamids katalysiert die Dihydrolipoyldehydrogenase unter Bildung von FADH_2 . Die Pyruvatdehydrogenase-Kinase, fest an den Komplex gebunden, führt die Pyruvatdehydrogenase durch Phosphorylierung eines Serinrests an der α -Kette der Pyruvatdehydrogenase in die inaktive Phosphoform über. Dephosphorylierend, also inaktivierend, wirkt die Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase, die locker mit dem Pyruvatdehydrogenasekomplex assoziiert ist (60).

Abb. 13

Schema der Interconversion der Pyruvatdehydrogenase aus (58).



Eine Reihe von Metaboliten vermag die Aktivität des Enzymkomplexes durch Beeinflussung einzelner Untereinheiten zu modifizieren. Erstens entfaltet Pyruvat an der Pyruvatdehydrogenase eine aktivierende Wirkung durch Hemmung der Kinase (61). Die K_M (Pyruvat) des Pyruvatdehydrogenasekomplexes aus Rattenlebermitochondrien beträgt 0,3 - 0,4 mM (62). Zweitens hemmt ADP die Kinase kompetitiv, wie Versuche

an isolierten Mitochondrien zeigten (62, 63), während AMP keine Wirkung auf die Pyruvatdehydrogenaseaktivität hat (59, 61). Die K_I (ADP) beträgt 0.1 mM für das Enzym aus Rinderherz (61). Kürzlich konnte eine direkte Beziehung zwischen dem mitochondrialen ATP/ADP und dem Verhältnis von inaktiver (Phospho-) und aktiver (De-phospho-)Form der Pyruvatdehydrogenase gezeigt werden (58, 64, 65). Die regulierende Wirkung des ADP/ATP kommt auf zwei Wegen zustande. ADP konkurriert mit dem Substrat ATP an der Pyruvatdehydrogenase-Kinase. Ein Anstieg des ADP/ATP führt zur Erhöhung der Mg^{++} Konzentration, da ADP schwächere Komplexe mit Mg^{++} bildet als ATP. Erhöhung der Mg^{++} Konzentration aktiviert die Phosphatase. Ca^{++} und Mg^{++} sind zwar als Aktivatoren sowohl für den Pyruvatdehydrogenasekomplex als auch für Kinase und Phosphatase nötig (66, 67), eine mögliche regulatorische Bedeutung des Mg^{++} ist aber nur für die Phosphatase wegen der hohen K_A (Mg^{++}) = 20 mM zu erwarten (66, 68). Auch die Produkte der Pyruvatdehydrogenasereaktion beeinflussen den Aktivitätszustand. NADH wirkt durch Hemmung des Flavoproteins Dihydrolipoyldehydrogenase (69, 70). Wieland et al. fanden in Gegenwart von 50 μ M NADH eine 50 %ige Hemmung der Pyruvatdehydrogenase aus Schweineherz (70). Ebenfalls aktivitätsmindernd wirkt Acetyl-CoA durch Hemmung der Transacetylase (71). Die K_I (Acetyl-CoA) beträgt 12.5 μ M für das Enzym aus Rattenherz (71). Vor kurzem wurde eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase-Kinase durch NAD und Coenzym A, eine Aktivierung durch NADH und Acetyl-CoA berichtet (72). Für CO_2 , das dritte Produkt aus Pyruvat, ist bislang kein Effekt auf die Pyruvatdehydrogenase beschrieben. An isolierten Rattenlebermitochondrien konnten Portenhauser und Wieland einen aktivierenden Effekt von Entkopplern aufheben (64). Roche und Reed berichteten kürzlich, daß für die ADP abhängige Hemmung der Kinase aus Rindernieren monovalente Kationen wie K^+ und NH_4^+ nötig sind (73). Diese meist an Mitochondrien und am isolierten Enzym gewonnenen Ergebnisse wurden auch auf in vivo Bedingungen angewendet (5, 6).

Wie in 3.1. beschrieben führt Infusion von Ammoniumchlorid zu einer Reihe von Veränderungen der oben genannten aktivitätsbeeinflussenden Parameter. Die Glutamatdehydrogenasereaktion bedingt ein Absinken von α -Ketoglutarat und eine Oxidation im mitochondrialen NADPH- und NADH-System; die Harnstoffproduktion geht mit einem Verbrauch von energiereichen Phosphaten einher.

3.2.2. Effekt von Ammoniumionen auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, beträgt die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase in der Leber gefütterter Ratten, die mit $[\text{Laktat}] = [\text{Pyruvat}] = 0.3 \text{ mM}$ perfundiert wurden, 20 % ihrer Gesamtaktivität. Ähnliche Werte fanden auch Patzelt et al. (74). Nach fünfminütiger Infusion von 2.1 mM Ammoniumchlorid beträgt die Aktivität etwa 40 % der Gesamtaktivität, wobei die Gesamtaktivität der Pyruvatdehydrogenase gegenüber der Kontrolle unverändert bleibt. Diese Verdoppelung der Pyruvatdehydrogenaseaktivität während Infusion von 2.1 mM Ammoniumchlorid ist reversibel und beruht auf kovalenter Interconversion durch Dephosphorylierung/Phosphorylierung. Führt man diese Versuche nicht mit $[\text{Pyruvat}] = 0.3 \text{ mM}$, sondern mit 1.5 mM im arteriellen Perfusat durch, so sollte die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase bereits in der Kontrollperiode erhöht sein, da Pyruvat selbst einen aktivierenden Einfluß ausübt. Tabelle 6 zeigt, daß der Wechsel von 0.3 auf 1.5 mM Pyruvat einen Anstieg der Pyruvatdehydrogenaseaktivität von 20 % auf 50 % der Gesamtaktivität bedingt. Ammoniumchloridinfusion (2.1 mM) steigert dann auf 70 % der Gesamtaktivität. In beiden Fällen, sowohl mit 1.5 mM als auch mit 0.3 mM Pyruvat, ist der durch Ammoniumionen bedingte Aktivitätszuwachs etwa gleich und beträgt ca. $0.15 \text{ Einheiten} \times (\text{g Leber})^{-1}$. Unter der Annahme, daß die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase bei einer Leberoberflächentemperatur von 37°C doppelt so hoch ist als bei 25°C , der Temperatur, bei der die Pyruvatdehydrogenaseaktivitätsbestimmung durchgeführt wurde, einem geschätzten Lebergewicht von 7 g, und einem Durchfluß von 26 ml/min, kann man das theoretisch zu erwartende Absinken der Pyruvatkonzentration im Perfusat aufgrund der durch Ammoniumionen induzierten Pyruvatdehydrogenaseaktivitätsänderung berechnen.

$$\Delta \text{Pyruvat (mM)} = \text{Aktivität} \times \text{Temperaturfaktor} \times \text{Lebergewicht} \times (\text{Durchfluß})^{-1}$$

Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 7 aufgetragen. Eine relativ gute Übereinstimmung findet sich zwischen gemessenem und theoretisch ermitteltem Wert, wenn die Pyruvatkonzentration 0.3 mM beträgt,

Tabelle 6

Anstieg der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase in der perfundierten Rattenleber während Zugabe von NH_4Cl (2.1 mM). Nach einer Perfusionsdauer von 25 Minuten wurde die Gewebsprobe A, nach 40 Minuten die Gewebsprobe B durch Frierstop entnommen. NH_4Cl Zugabe erfolgte 5 Minuten vor dem Frierstop (d. h. nach 20 Minuten für Stop A, nach 35 Minuten für Stop B). Die arterielle Laktatkonzentration betrug immer 0.3 mM. Die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase wurde vor (spontan) und nach Aktivierung (Gesamtaktivität = total) durch Mg^{++} und Pyruvatdehydrogenasephosphatase gemessen (siehe 2.3.4.).

Pyruvat arteriell mM	Perfusions- Nummer	Frier- stop	NH_4Cl Zusatz mM	Laktat		Laktat Pyruvat Perfusat	Aktivität der Pyruvatde- hydrogenase	
				im ausfließenden	Perfusat		Einheiten/g Leber spontan total	% total
0.3	702	A	-	0.78	0.29	2.7	0.16	0.71
		B	2.1	0.62	0.15	4.1	0.33	0.87
	703	A	2.1	0.56	0.10	5.6	0.32	0.71
		B	-	0.53	0.18	2.9	0.16	0.68
1.5	704	A	-	0.70	0.95	0.8	0.26	0.56
		B	2.1	0.65	0.53	1.2	0.39	0.57
	705	A	2.1	0.82	0.43	1.9	0.54	0.63
		B	-	0.83	0.91	0.9	0.37	0.69

während im Falle von 1.5 mM Pyruvat die gemessene zusätzliche Pyruvataufnahme durch Ammoniumchlorid deutlich höher liegt als aufgrund des Aktivitätszuwachses der Pyruvatdehydrogenase zu erwarten wäre. Auch in diesem Falle war keine erhöhte Laktat- und Glucoseproduktion zu finden.

Tabelle 7 Vergleich zwischen gemessenem und aus der Pyruvatdehydrogenaseaktivierung errechnetem Absinken der Pyruvatkonzentration im ausfließenden Perfusat. Die Berechnung erfolgte unter Annahme eines Lebergewichts von 7 g, eines Durchflusses von 26 ml/min und unter Verwendung der Pyruvatdehydrogenaseaktivitätsänderungen während Infusion von Ammoniumchlorid aus Tabelle 6. Zur Umrechnung der Aktivitäten von 25° C auf 37° C wurde ein Temperaturfaktor = 2 verwendet.

Perfusions- nummer	[Pyruvat] arteriell	Absinken der Pyruvatkonzentration bei Infusion von 2.1 mM Ammonium- chlorid	
	mM	gemessen	errechnet
		μM	
702	0.3	0.14	0.12
703	0.3	0.08	0.09
704	1.5	0.22	0.07
705	1.5	0.48	0.09

Die durch kovalente Interconversion der Pyruvatdehydrogenase bedingte Aktivitätssteigerung durch Ammoniumionen läßt sich auch an der $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus 1- ^{14}C -Pyruvat beobachten (Abb. 14 b)). Der zeitliche Verlauf der $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung entspricht dem der erhöhten Pyruvataufnahme durch die Leber. Mit der erhöhten CO_2 Freisetzung aus Pyruvat geht ein Anstieg des Acetyl-CoA- und ein Absinken des freien Coenzym A-Spiegels einher. Frierstopmessungen an einer Leber, die mit $[\text{Laktat}] = [\text{Pyruvat}] = 0.4 \text{ mM}$ unter Verwendung von

HEPES als Puffer perfundiert wurde, ergaben ein Absinken des freien Coenzym A-Gehaltes von 91 auf $34 \text{ nMol} \times (\text{g Leber})^{-1}$ während Infusion von 1,3 mM Ammoniumchlorid.

3.2.3. Energieverbrauch bei der Harnstoffsynthese und Aktivität der Pyruvatdehydrogenase

Zu den möglichen Ursachen der in 3.2.2. beschriebenen Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase könnte ein Absinken des mitochondrialen ATP/ADP zählen.

Wie Tabelle 8 zeigt, ändert sich der Gewebsgehalt an ATP bei Zugabe von 1,5 mM Ammoniumchlorid jedoch nicht. Größere ATP Spiegeländerungen sind auch bei intakter Atmungskontrolle nicht zu erwarten. Allerdings besteht die Möglichkeit, daß die Pyruvatdehydrogenase durch kleine Schwankungen der mitochondrialen ATP Konzentration reguliert wird, die mit Hilfe von Gewebsgehaltsmessungen nicht zu erfassen sind, da die Adennukleotide der Zelle weitgehend im Zytosol lokalisiert sind (87).

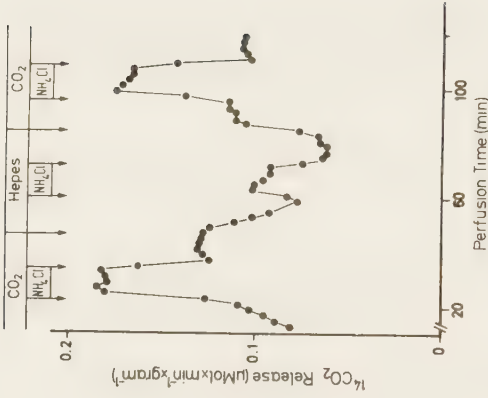
Die Harnstoffproduktion ist bei Fehlen von zugeführtem CO_2 gestoppt. Dies ergab die Möglichkeit, die Harnstoffproduktion als Hauptquelle des zusätzlichen Energieverbrauchs bei Ammoniumchloridinfusion auszuschalten (75). Schon früher haben Krebs und Henseleit gefunden, daß die Harnstoffproduktion von Leberschnitten in Abwesenheit von CO_2 um etwas mehr als 50 % gesenkt wurde (12). Die $K_M(\text{HCO}_3^-)$ der Carbamylphosphatsynthetase beträgt 5,3 mM (77). Diese Reaktion limitiert die Harnstoffsynthese, wenn die Leber mit CO_2 freiem Medium perfundiert wird. Wird der Bikarbonatpuffer (26,2 mM NaHCO_3 äquilibriert mit 5 % CO_2 und 95 % O_2 im Gasgemisch) durch 4,6 mM HEPES (äquilibriert mit 100 % O_2) bei Konstanzhaltung des extrazellulären pH ersetzt, ist keine Harnstoffbildung, keine Nettoammoniakaufnahme und keine Mehratmung im stationären Zustand zu beobachten (Abb. 14 a)). Die Registrierung von pH und Sauerstoff im Perfusat ist ähnlich der bei Infusion von Methylammoniumchlorid erhaltenen (Abb. 4).

Tabelle 8 Adeninnukleotidgehalte perfundierter Rattenlebern.
Der Frierstop erfolgte nach 20minütiger Perfusionszeit.
Die Zugabe von Ammoniumchlorid erfolgte 5 Minuten vor
dem Stop. Mittelwerte $\pm$ S.E.M. (n = 4)

Perfusions- medium	NH ₄ Cl mM	ATP nMol x (g Leber) ⁻¹	ADP nMol x (g Leber) ⁻¹	AMP
Bikarbonat- puffer 25 mM	-	2455 $\pm$ 105	542 $\pm$ 30	78 $\pm$ 6
(O ₂ /CO ₂ , 95/5)	1.5	2447 $\pm$ 148	461 $\pm$ 45	70 $\pm$ 15
HEPES 4.6 mM	-	2859 $\pm$ 98	649 $\pm$ 37	63 $\pm$ 9
(100 % O ₂)	1.5	2714 $\pm$ 116	624 $\pm$ 38	67 $\pm$ 5

Bestimmung der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase unter solchen Bedingungen ergab bei Infusion von 2.1 mM Ammoniumchlorid einen Anstieg von 0.21 Einheiten x (g Leber)⁻¹ auf 0.42 Einheiten x (g Leber)⁻¹. Vergleichbare Werte mit Bikarbonatpuffer betrugen 0.17 bzw. 0.34 Einheiten x (g Leber)⁻¹. Ammoniumchloridinfusion hat also bei Verwendung beider Puffersysteme etwa den gleichen Effekt auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase, trotz der verschiedenen Zustände hinsichtlich des Energieverbrauchs durch die Harnstoffproduktion.

Die Freisetzung von ¹⁴CO₂ aus 1-¹⁴C-Pyruvat wird auch im CO₂freien Puffer durch Ammoniumionen gesteigert. Sowohl bei bikarbonat- als auch bei HEPES-gepufferter Perfusion beträgt die Steigerung der ¹⁴CO₂ Abgabe durch Ammoniumionen etwa 40 % des Kontrollwerts (Abb. 14 b)). Dieser liegt jedoch in HEPES um ein Drittel niedriger als in Bikarbonatpuffer. Pyruvatdehydrogenaseaktivität und ¹⁴CO₂ Abgabe in das Perfusat müssen also nicht immer parallel laufen. Möglicherweise wird unter CO₂freien Perfusionsbedingungen das aus Pyruvat freigesetzte CO₂ verstärkt durch Biotinenzyme abgefangen, so daß trotz gleichbleibender Pyruvatdecarboxylierungsrate vermindert CO₂ ins



b) $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat in das Perfusat der perfundierten Rattenleber des Experiments aus Abb. 14 a). In beiden Puffersystemen bewirkt NH_4Cl (1.2 mM) einen Anstieg der $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat um ca. 40 %.

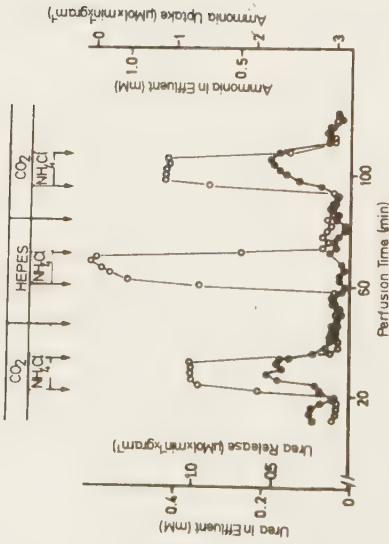


Abb. 14

a) Harnstoff- (●) und Ammoniumionenkonzentration (○) im ausfließenden Perfusat der perfundierten Rattenleber während Gabe von NH_4Cl (1.2 mM) in Abhängigkeit vom verwendeten Puffersystem. Die Harnstoffmehrprouktion ist bei Ersatz des Bikonarbonatpuffers durch HEPES unterdrückt. In beiden Puffersystemen finden sich 95 % des zugesetzten NH_4Cl in Form von Harnstoff bzw. nicht aufgenommenen Ammoniak im Effluent wieder. Die Harnstoffproduktion ist relativ niedrig, da das Experiment bei 33°C durchgeführt wurde.

Perfusat abgegeben wird. Zu dieser Erklärung paßt auch, daß im HEPES- wie auch im bikarbonatgepufferten Experiment die halbmaximale Ammoniumchloridkonzentration für die zusätzliche Pyruvat-aufnahme etwa 0.7 mM beträgt. Das zeigt auch der gleiche Verlauf der venösen Pyruvatkonzentration während einer Ammoniumchloridtitration in Bikarbonatpuffer (a) und in HEPES (b) (Abb. 15).

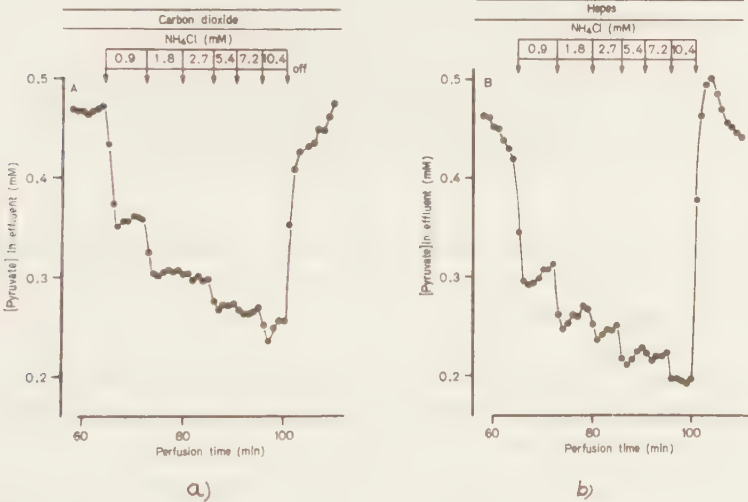


Abb. 15 Pyruvatkonzentration im ausfließenden Perfusat der perfundierten Rattenleber während Infusion verschiedener Konzentrationen von NH_4Cl bei Verwendung von
a) Bikarbonatpuffer
b) HEPES

Die Pyruvatkonzentration zeigt in beiden Puffersystemen etwa den gleichen Verlauf. In beiden Perfusionen betrug die arterielle Laktatkonzentration 4.3 mM, die arterielle Pyruvatkonzentration 0.46 mM.

Die Verwendung von zwitterionischen Puffersystemen, wie HEPES, verursacht gegenüber Bikarbonatpuffer eine intrazelluläre Alkalisierung bis zu 0,5 pH Einheiten (54). Daher wurde zum Vergleich das metabolisch inerte und permeierende DMO als Puffersubstanz verwendet, das den intrazellulären pH nicht zum Alkalischen verschiebt. Wie bei Perfusion mit HEPES als Puffer ist auch mit DMO oder mit Phosphatpuffer die Nettoaufnahme von Ammoniumionen unterdrückt, ebenso ist keine Harnstoffproduktion und keine Sauerstoffmehraufnahme zu beobachten.

Wie Tabelle 8 zeigt, hat auch mit HEPES die Infusion von 1,5 mM Ammoniumchlorid keinen Einfluß auf die Gewebsgehalte von ATP, ADP, AMP.

3.2.4. Einfluß von Ammoniumionen auf den mitochondrialen Redoxzustand und seine Beziehung zur Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase durch Ammoniumionen.

Die Reaktion von Ammoniumionen an der Glutamatdehydrogenase bedingt eine Oxidation von mitochondrialem NAD(P)H. Dabei ist NADPH der Hauptreaktionspartner (10, 43, 44).

Wie bereits früher von Sies beschrieben (78), führt Infusion von Ammoniumionen zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität (> 405 nm) und der Absorption eines Leberlappens bei dem Wellenlängenpaar 350 minus 377 nm. Dies zeigt auch Abb. 16. Mehrere Titrationsexperimente bei einer Leberoberflächentemperatur von 33°C zeigten, daß der halbmaximale Effekt in der Absorptionsregistrierung bei einer Ammoniumionenkonzentration von 0,3 - 0,5 mM liegt; der maximale bei etwa 3 mM erreicht ist. Durch Kalibrierung mit dansyliertem Rinderserumalbumin (9) als extrazellulärem Fluoreszenz und Absorptionsstandard, und einem Inulinraum der perfundierten Leber von $0,35 \text{ ml} \times (\text{g Leber})^{-1}$ (54) läßt sich eine durchstrahlte Leberdicke von 4,2 mm errechnen. Infusion von 3,4 mM Ammoniumchlorid verursacht einen Absorptionenzuwachs von 0,132. Mit einem Extinktionskoeffizienten für

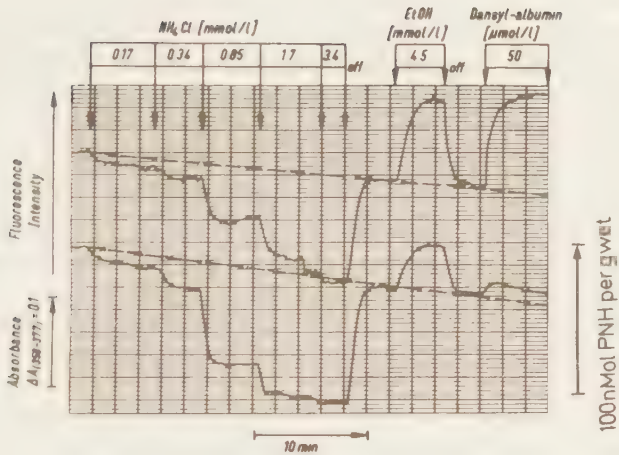


Abb. 16 Fluoreszenz- und Absorptionsregistrierung von einem perfundierten Leberlappen bei den für Nikotinamidnukleotide spezifischen Wellenlängen 350 nm minus 377 nm (Zweiwellenlängen-Verfahren). Dansyliertes Rinderserumalbumin wurde als extrazellulärer Fluoreszenz/Absorptionsstandard verwendet. Temperatur 33°C.

Nikotinamidnukleotide (350 - 377 nm) = $4.0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ und einer Leberdichte von 1.05 g/cm^3 läßt sich die durch 3.4 mM Ammoniumchlorid oxidierte Nikotinamidnukleotidmenge zu $75 \text{ nMol} \times (\text{g Leber})^{-1}$ berechnen. Bei einem Inulinraum von $0.18 \text{ ml} \times (\text{g Leber})^{-1}$ der Leber in situ (79) würde dies einer Oxidation von $90 \text{ nMol} \times (\text{g Leber})^{-1}$ entsprechen. Diese Berechnung hat jedoch nur abschätzenden Charakter, da der Extinktionskoeffizient des reagierenden Nikotinamidnukleotidpools nicht genau bekannt ist. Für die Glutamatdehydrogenase aus Rinderleber wurde gezeigt, daß die Bindung von Substrat oder Produkt an das Enzymprotein die spektralen Eigenschaften verändert (80 - 83).

Mit Hilfe der Fluoreszenzausbeute (9, 10), dem Verhältnis aus Änderung der Fluoreszenzintensität ΔF und der Absorptionsänderung ΔA während eines metabolischen Überganges, lassen sich einzelne funktionelle Nikotinamidnukleotidpools qualitativ charakterisieren. Setzt man das während Äthanolinfusion erhaltene $\Delta F / \Delta A = 4$ - es beschreibt überwiegend einen zytosolischen NADH Pool - so beträgt das $\Delta F / \Delta A$ während Ammoniumchloridinfusion ca. 1.6. Dieses besitzt damit ein 4fach niedrigeres $\Delta F / \Delta A$ als das β -Hydroxybutyrat/Acetoacetatsystem (84, 85), wie an isolierten Rattenlebermitochondrien gezeigt werden konnte. Es läßt sich auch abgrenzen von dem vorwiegend zytosolischen NADPH Pool, der mit dem mikrosomalen Monooxygenasesystem reagiert, dessen $\Delta F / \Delta A$ um 25 % höher liegt (78).

Mit Hilfe der Indikatormetabolitquotienten β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat bzw. Laktat/Pyruvat lassen sich Veränderungen des mitochondrialen bzw. zytosolischen NADH quantitativ erfassen (86, 87). Aus dem Absinken des β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat von 1,0 auf 0,8 (Abb. 10 c) während Gabe von 1,5 mM Ammoniumchlorid läßt sich nach Bücher (86) eine Änderung des mitochondrialen NADH Gehaltes von 51 auf 42 nMol $\times$ (g Leber)⁻¹ berechnen. Für den Anstieg des Laktat/Pyruvat von 1,9 auf 3,8 ergibt sich eine Änderung des zytosolischen NADH Gehaltes von 9 auf 17 nMol $\times$ (g Leber)⁻¹. Das mit Ammoniumionen reagierende Nikotinamidnukleotidsystem ist daher zu 90 % mitochondriales NADPH und nur zu 10 % mitochondriales NADH. Dies wird auch durch Gewebsgehaltmessungen bestätigt (Tabelle 9).

Tabelle 9 Metabolitgehalte perfundierter Rattenlebern (nMol/g perfundierte Leber). Der Frierestop erfolgte 5 Minuten nach Beginn der NH_4Cl Infusion. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ S.E.M. von je 4 Perfusionen angegeben. Die Gehalte an Ammoniak und Harnstoff stellen Mittelwerte von 3 Versuchen dar. Temperatur: 33°C .

NH_4Cl im einfließenden Perfusat	NADP	NAD	Glucose-6-phosphat	Ammoniak	Harnstoff
mM	nMol/g	nMol/g	nMol/g	nMol/g	nMol/g
-	68 ± 5	535 ± 47	37 ± 5	905	168
0.7	-	-	-	1517	246
1.4	130 ± 19	512 ± 29	30 ± 2	2085	371

Da Ammoniumionen in erster Linie mit mitochondrialem NADPH reagieren, ist eine Beeinflussung durch andere mitochondriales NADPH verbrauchende Prozesse zu erwarten. Dies zeigt Abb. 17. Infusion von t-Butylhydroperoxid verursacht eine Exidation im mitochondrialen wie im zytosolischen NADPH (88). Die reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat während Ammoniumchloridinfusion an der Glutamatdehydrogenase ist in Gegenwart von t-Butylhydroperoxid eingeschränkt und bedingt durch Mangel an Glutamat bzw. Aspartat eine Einschränkung der Harnstoffproduktion um über die Hälfte.

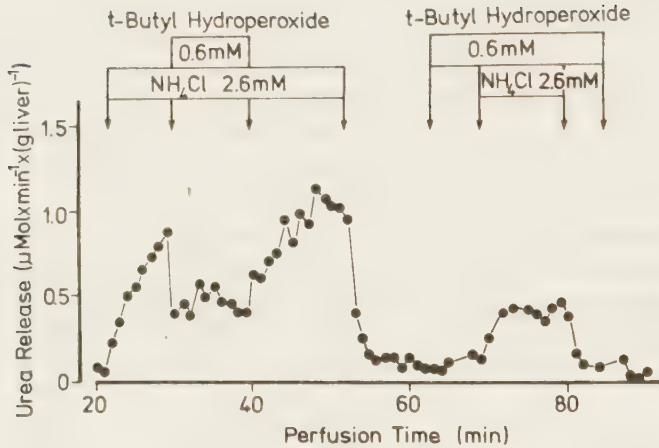


Abb. 17 Einfluß von t-Butylhydroperoxid auf die Harnstoffproduktion aus NH_4Cl der perfundierten Rattenleber. Da sowohl der Stoffwechsel von t-Butylhydroperoxid als auch NH_4Cl mit Verbrauch von mitochondrialem NADPH einhergeht, ist eine gegenseitige Beeinflussung der Umsatzraten gegeben. Die arterielle Laktatkonzentration betrug 0.4 mM, die arterielle Pyruvatkonzentration 0.4 mM.

Aufgrund der geschilderten Redoxveränderungen während Ammoniumchloridinfusion besteht die Möglichkeit, daß die Änderungen im mitochondrialen NADH eine Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase bedingen. NADPH dagegen hat keinen Einfluß auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase (69).

Um den isolierten Effekt des mitochondrialen NADH/NAD Systems auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase zu untersuchen, wurde das mitochondriale NADH/NAD durch Infusion von Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat verändert. In Gegenwart von Acetoacetat (4.6 mM) erhöht Ammoniumchloridgabe die $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus 1- ^{14}C -Pyruvat um 70 %, die Steigerung beträgt dagegen nur 10 - 20 %, wenn Acetoacetat durch β -Hydroxy-

butyrat ersetzt wird (Abb. 18). Ohne Zusatz von β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat steigerte 1.4 mM Ammoniumchlorid die $^{14}\text{CO}_2$ Abgabe in das Perfusat um 40 % (siehe Abb. 14 b)). Beide Metabolite haben allein jedoch, das heißt ohne zusätzliche Ammoniumchloridinfusion nur einen kleinen Effekt auf die $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus 1- ^{14}C -Pyruvat.

Die Harnstoffproduktion wird durch die erzwungene Veränderung des mitochondrialen NADH/NAD nicht beeinflusst, im Gegensatz zur $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus 1- ^{14}C -Pyruvat während Ammoniumchloridinfusion.

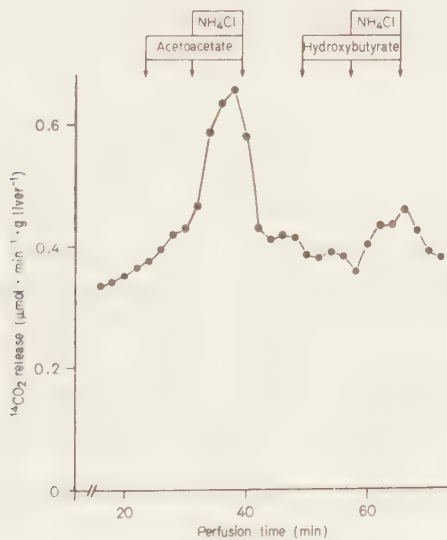


Abb. 18 Effekt von Acetoacetat (4.6 mM) und DL- β -Hydroxybutyrat (7.8 mM) auf die NH_4Cl (1.4 mM) bedingte Steigerung der $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus 1- ^{14}C -Pyruvat in das Perfusat der perfundierten Rattenleber. Die arterielle Pyruvatkonzentration betrug 0.5 mM.

Die modifizierende Wirkung von Acetoacetat oder β -Hydroxybutyrat auf die Aktivitätssteigerung der Pyruvatdehydrogenase durch Ammoniumionen ist entweder durch einen direkten NADH Effekt zu erklären oder durch die Erhöhung der mitochondrialen α -Ketoglutaratkonzentration durch Gabe von β -Hydroxybutyrat bzw. Senkung durch Acetoacetat. Der hemmende Einfluß von α -Ketoglutarat auf die Pyruvatdehydrogenaseaktivität konnte bei entkoppelten Rattenlebermitochondrien (Dinitrophenol) gezeigt werden (64).

3.2.5. Ammoniumionenbedingte Pyruvataufnahme während Glucogenese und Anoxie

Auch bei Glucogenese aus Pyruvat in Lebern von Ratten, denen 24 Stunden vor dem Versuch das Futter entzogen wurde, erhöht Ammoniumchlorid die Pyruvataufnahme durch die Leber (Tabelle 10). Es resul-

Tabelle 10 Einfluß von NH_4Cl auf die Pyruvataufnahme der perfundierten Rattenleber während Glucogenese. Die Leber einer 24 Stunden vor dem Versuch hungernden Ratte wurde arteriell mit 3 mM Na-Pyruvat, entsprechend einem arteriellen Pyruvatangebot von $11.1 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} (\text{g Leber})^{-1}$, perfundiert.

NH_4Cl im ein- fließenden Perfusat mM	Abgabe von C_3 -Einheiten in das ausfließende Perfusat			
	als L-Laktat	als Pyruvat	als Glucose	gesamt
	$\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} (\text{g Leber})^{-1}$			
-	1.67	8.15	0.96	10.7
1.3	1.33	6.45	0.85	8.6

tierte eine Glucoseproduktion von $0.48 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$, während $1.67 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$ zu Laktat reduziert wurden. Aus Tabelle 10 ist weiterhin zu ersehen, daß von den C_3 -Einheiten, die

mit einer Konzentration von 3 mM als Pyruvat infundiert wurden, wieder 2.9 mM als Pyruvat, Laktat oder Glucose im venösen Perfusat erscheinen. Pyruvat wird also in nur geringem Maße zur Energiegewinnung herangezogen. Zusätzliche Infusion von 1.3 mM Ammoniumchlorid bedingt einen 10 %igen Abfall der Glucoseproduktion, jedoch wurden in diesem Fall von der Leber netto $2.5 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$ Pyruvat aufgenommen, die nicht als Glucose und Laktat erschienen.

Auch während anoxischer Bedingungen ist Ammoniumchlorid in der Lage, die Nettopyruvataufnahme durch die Leber zu steigern. Dies zeigt Abb. 19. Die Zunahme der Laktatkonzentration kann auch unter diesen Bedingungen die zusätzliche Pyruvataufnahme während Ammoniumchloridinfusion nicht erklären.

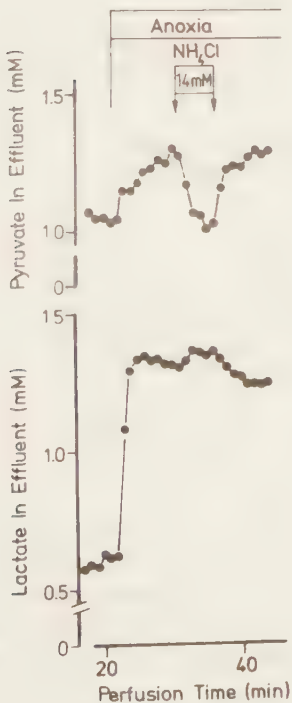


Abb. 19

Laktat- und Pyruvatkonzentration im ausfließenden Perfusat der perfundierten Rattenleber während Infusion von NH_4Cl (1.4 mM) bei Anoxie. Die arterielle Laktatkonzentration betrug 0.1 mM, die Pyruvatkonzentration 1.5 mM.

3.2.6. Hemmung der Pyruvatdehydrogenase und Glutaminmetabolismus

Wie schon oben erwähnt, scheint dem α -Ketoglutaratspiegel eine besondere Rolle bezüglich der Regulation der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase zuzukommen (64). Es wurde daher versucht die Ammoniakkonzentration in der Leber zu erhöhen, ohne gleichzeitig den α -Ketoglutaratspiegel zu senken. Da die Zellmembran für α -Ketoglutarat und Glutamat nicht genügend permeabel ist, wohl aber für Glutamin, wurde dieses infundiert um intrazellulär Glutamat, Ammoniak und α -Ketoglutarat zu erzeugen. Diese Experimente werden im folgenden kurz dargestellt.

Bei 15minütiger Infusion von 6 mM Glutamin allein und zusammen mit 0.3 mM Ammoniumchlorid findet keine Nettofreisetzung von Ammoniumionenäquivalenten (d. h. als Harnstoff, Alanin, freier Ammoniak) aus Glutamin statt (Abb. 20). Nach einer 3 - 4minütigen Erhöhung der

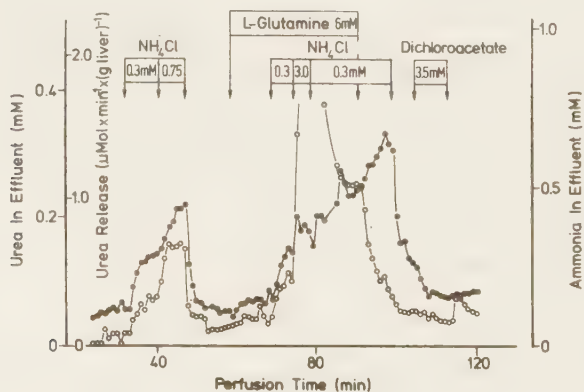


Abb. 20 Harnstoff- (●) und Ammoniakkonzentration (○) im ausfließenden Perfusat der perfundierten Leber vor und nach Stimulation der Amidohydrolyse von Glutamin (6 mM) durch 4minütige Infusion von NH_4Cl (3 mM). Die arterielle Laktatkonzentration betrug 0.63 mM, die Pyruvatkonzentration 1.1 mM.

Ammoniumchloridkonzentration auf 3 mM und anschließender Rückkehr zu 0.3 mM, steigt jedoch die Konzentration von Harnstoff von 0.14 auf 0.25 mM, die Konzentration von Alanin von 0.005 auf 0.126 mM und die Ammoniakkonzentration von 0.18 auf 0.51 mM im stationären Zustand an. Diese Stimulation der Amidohydrolyse von Glutamin durch 3 - 4minütige Gabe von Ammoniumchlorid (3 mM) zeigt sich auch in der $^{14}\text{CO}_2$ Abgabe in das Perfusat aus U- ^{14}C -Glutamin (Abb. 21).

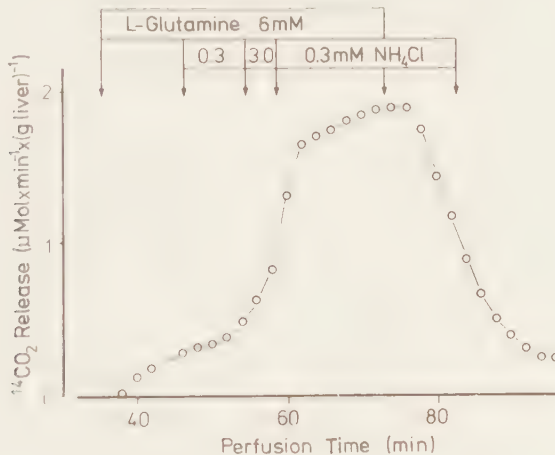


Abb. 21 $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus U- ^{14}C -Glutamin in das Perfusat der perfundierten Rattenleber. Infusion von NH_4Cl (3 mM) für 4 Minuten stimuliert die Oxidation von Glutamin (6 mM). Die arterielle Laktatkonzentration betrug 0.8 mM, die Pyruvatkonzentration 1.3 mM.

Wie weitere Versuche ergaben, ist dieser stimulierende Effekt nicht mit Methylammoniumionen zu erzielen und beruht nicht auf einer Beeinflussung glutamatabbauender Reaktionen. Die Steigerung der Amidohydrolyse von Glutamin durch Ammoniumionen konnte auch im Mitochondrienhomogenat gezeigt werden (Abb. 22). Die Glutamatbildung aus Glutamin zeigte dabei einen sigmoidalen Verlauf in Abhängigkeit von der zugesetzten Glutaminkonzentration, wie er auch von anderen Untersuchern be-

schrieben wurde (89), und war proportional der Reaktionszeit und der eingesetzten Menge an mitochondrialem Protein. Allerdings variierte das Ausmaß der ammoniumchloridabhängigen Stimulation.

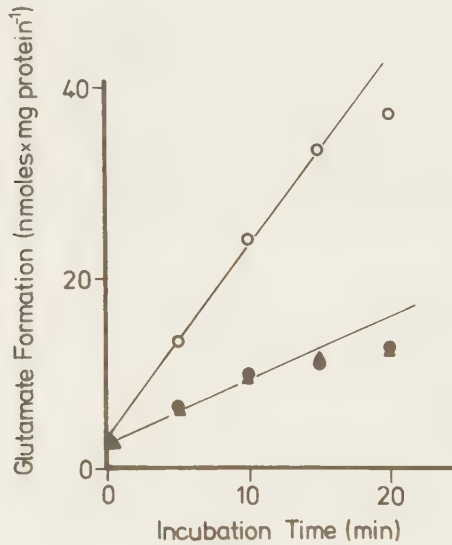


Abb. 22 Glutamatbildung aus Glutamin im Mitochondrienhomogenat. Mit NH_4Cl (3 mM), jedoch nicht mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (3 mM) ist eine Steigerung der Amidohydrolyse von Glutamin (12 mM) zu erreichen. Experimentelles Vorgehen siehe 2.3.5..

Charles konnte zeigen, daß die mitochondriale Glutamatbildung aus 10 mM Glutamin in Gegenwart von 5 mM Ammoniumchlorid um etwa 50 % erhöht ist und schrieb dieses Ergebnis einer Aktivierung der Glutaminase durch Ammoniumionen zu (90).

Auch an der lebenden Ratte wurde nach intraperitonealer Applikation von 2.5 mMol Ammoniumchlorid pro kg Körpergewicht ein Absinken des Leberglutamingehaltes von 4 auf 1,8 $\mu\text{Mol} \times (\text{g Leber})^{-1}$ gezeigt (91). Dieses Ergebnis konnte ebenfalls auf eine Aktivitätssteigerung der

Glutaminase zurückgeführt werden (92). Näheres über die Steigerung der Amidohydrolyse von Glutamin durch Ammoniumionen siehe (93).

Der Versuch in Abb. 20 zeigte während Infusion von 0,3 mM Ammoniumchlorid und 6 mM Glutamin vor Aktivierung der hydrolytischen Desamidierung von Glutamin (= Zustand I) eine Konzentration von Ammoniumionenäquivalenten in Form von Harnstoff, Alanin und freiem Ammoniak von 0,5 mM. Nach dem aktivierenden vierminütigen Ammoniumchloridpuls von 3 mM sind es 1,14 mM (= Zustand II), wobei die Zusammensetzung des arteriellen Perfusats in Zustand I die gleiche ist wie in Zustand II.

Dieser Anstieg der Ammoniumionenäquivalente geht jedoch nicht mit einer Zunahme, sondern sogar mit einem Absinken der Pyruvatdehydrogenaseaktivität um 15 - 20 % der Gesamtaktivität einher (Tabelle 11). Auch die $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus 1- ^{14}C -Pyruvat ist während Zustand II verglichen mit Zustand I um 50 % verringert (Abb. 23). Das heißt also, daß in Gegenwart von Ammoniumionen, wobei aber α -Ketoglutarat nicht zusätzlich verbraucht wird, auch kein Anstieg der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase zu finden ist.

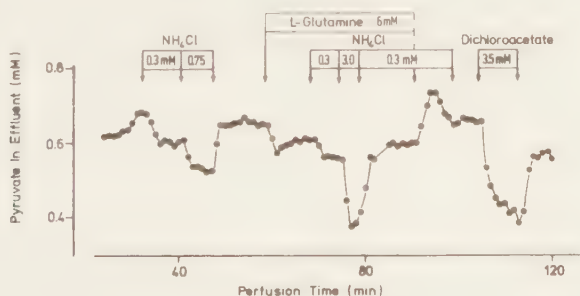


Abb. 23 a) Pyruvatkonzentration im ausfließenden Perfusat der perfundierten Rattenleber des Experiments von Abb. 20.

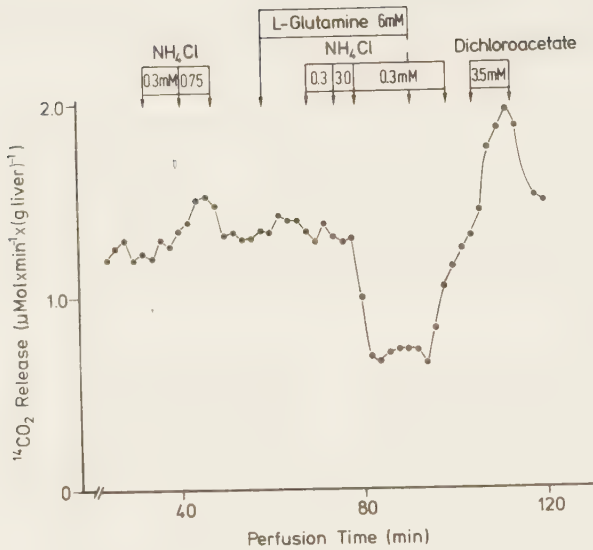


Abb. 23 b) Einfluß der Stimulation der Amidohydrolyse von Glutamin (6 mM) auf die $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus 1- ^{14}C -Pyruvat in das Perfusat der perfundierten Rattenleber des Experiments von Abb. 20.

Glutaminase zurückgeführt werden (92). Näheres über die Steigerung der Amidohydrolyse von Glutamin durch Ammoniumionen siehe (93).

Der Versuch in Abb. 20 zeigte während Infusion von 0.3 mM Ammoniumchlorid und 6 mM Glutamin vor Aktivierung der hydrolytischen Desamidierung von Glutamin (= Zustand I) eine Konzentration von Ammoniumionenäquivalenten in Form von Harnstoff, Alanin und freiem Ammoniak von 0.5 mM. Nach dem aktivierenden vierminütigen Ammoniumchloridpuls von 3 mM sind es 1.14 mM (= Zustand II), wobei die Zusammensetzung des arteriellen Perfusats in Zustand I die gleiche ist wie in Zustand II.

Dieser Anstieg der Ammoniumionenäquivalente geht jedoch nicht mit einer Zunahme, sondern sogar mit einem Absinken der Pyruvatdehydrogenaseaktivität um 15 - 20 % der Gesamtaktivität einher (Tabelle 11). Auch die $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus 1- ^{14}C -Pyruvat ist während Zustand II verglichen mit Zustand I um 50 % verringert (Abb. 23). Das heißt also, daß in Gegenwart von Ammoniumionen, wobei aber α -Ketoglutarat nicht zusätzlich verbraucht wird, auch kein Anstieg der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase zu finden ist.

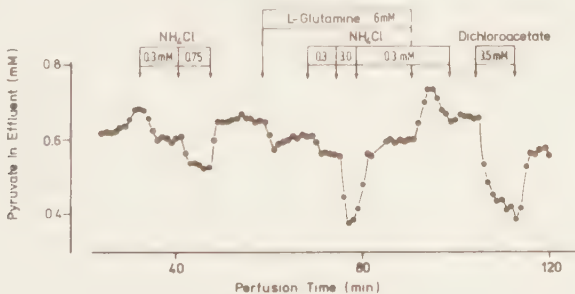


Abb. 23 a) Pyruvatkonzentration im ausfließenden Perfusat der perfundierten Rattenleber des Experiments von Abb. 20.

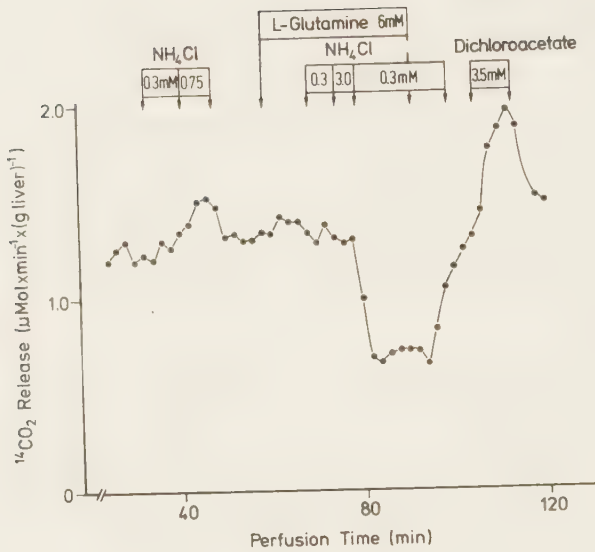


Abb. 23 b) Einfluß der Stimulation der Amidohydrolyse von Glutamin (6 mM) auf die $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus 1- ^{14}C -Pyruvat in das Perfusat der perfundierten Rattenleber des Experiments von Abb. 20.

Tabelle 11

Einfluß der Aktivierung der Amidohydrolyse von Glutamin durch NH_4Cl auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase. Bei beiden Versuchen wurde nach 25minütiger Perfusion Glutamin (6 mM) und nach weiteren 10 Minuten NH_4Cl (0,3 mM) zugegeben. Nach 41 Minuten Perfusionszeit erfolgte Frierstop A. Sofort anschließend wurde die NH_4Cl Konzentration auf 3 mM erhöht und nach 4 Minuten wieder auf 0,3 mM gesenkt. Nach weiteren 10 Minuten (nach 55 Minuten Perfusionszeit) wurde Frierstop B genommen. Alle Frierstops (A, B) erfolgten also unter den gleichen Infusionsbedingungen (6 mM Glutamin, 0,3 mM NH_4Cl). Frierstop B unterschied sich lediglich von Stop A durch die vorausgehende Aktivierung der Amidohydrolyse von Glutamin durch NH_4Cl (3 mM). Die arterielle Laktatkonzentration betrug 0,8 mM, die arterielle Pyruvatkonzentration 1,3 mM. Die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase wurde vor (spontan) und nach Aktivierung (Gesamtaktivität = total) durch Mg^{++} und Pyruvatdehydrogenasephosphatase gemessen (siehe 2,3,4.). Die Spalte "Stickstoff aus Glutamin" umfaßt den Stickstoffzuwachs im Perfusat in Form von Alanin, Harnstoff, NH_4^+ in Stop B gegenüber Stop A.

Versuch	Stop	Perfusionsmedium	Laktat im ausfließenden Perfusat		Stickstoff freigesetzt aus Glutamin		Pyruvatdehydrogenase Aktivität		% total
			mM	mM	mM	mM	spontan	total	
1049	A	NaHCO_3 (25 mM ³)	1.23	0.63	0.02	0.67	0.24	0.49	49
	B		1.22	0.78	0.10		0.09	0.32	30
1050	A	$\text{O}_2/\text{CO}_2 =$ 95/5	1.24	0.58	0.02	0.57	0.16	0.35	46
	B		1.32	0.70	0.12		0.11	0.34	33

4. DISKUSSION

4.1. Einfluß des Stoffwechsels von Ammoniumionen auf den Aktivitätszustand der Pyruvatdehydrogenase

Infusion von Ammoniumionen bedingt in der perfundierten Rattenleber einen Anstieg der aktiven (Dephospho-) Form der Pyruvatdehydrogenase. Dieses Ergebnis ist nicht durch eine aktivierende Wirkung der Ammoniumionen per se zu erklären, da diese Aktivitätssteigerung in ihrem Ausmaß vom mitochondrialen NADH/NAD abhängig ist. Außerdem findet sich eine Verminderung der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase, wenn Ammoniumionen intrazellulär aus Glutamin erzeugt werden. Die von Roche und Reed berichtete Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase durch monovalente Kationen wie NH_4^+ oder K^+ spielt in den geschilderten Experimenten keine Rolle, da die Effekte beider Ionen nicht additiv sind (persönliche Mitteilung) und bei einer Konzentration $[\text{K}^+] = 90 \text{ mM}$ bereits maximal sind. Der K^+ -Gehalt der menschlichen Erwachsenenleber liegt bei 75 mMol/kg Leber frisch (94). Es ist also der Stoffwechsel von Ammoniumionen, welcher die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase beeinflusst. Weiterhin kann gesagt werden, daß die Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase mittels kovalenter Interkonversion nicht durch einen gesteigerten Energieverbrauch durch die Harnstoffbildung oder Glutaminsynthese erklärbar ist. Dies zeigt sich im unterschiedlichen zeitlichen Verlauf von Pyruvatnettoaufnahme durch die Leber und der Harnstoffproduktion. Die Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase durch Ammoniumionen tritt auch bei CO_2 -freier Perfusion - also bei gehemmter Harnstoffsynthese und fehlender Sauerstoffmehraufnahme - in gleichem Maße auf. Bei Gabe von Aminoöxyessigsäure - dem Hemmstoff der Transaminierungsreaktion - zusammen mit Ammoniumchlorid ist die Harnstoffproduktion eingeschränkt, während die ammoniakbedingte Pyruvatmehraufnahme durch Aminoöxyessigsäure unbeeinflusst bleibt. Scholz und Bücher berichteten beim Übergang von Normoxie zu Anoxie ein Absinken des ATP:ADP von 2.6 auf 0.2 (87). Auch unter diesen Bedingungen erhöhen Ammoniumionen die Pyruvatnettoaufnahme durch die Leber, trotz fehlender Harnstoffsynthese während Anoxie.

Da die Carbamylphosphatsynthetase ebenso wie die Pyruvatdehydroge-

nase in den Mitochondrien lokalisiert ist, würden diese Befunde bedeuten, daß der Pyruvatdehydrogenasekomplex einer Regulation durch einen bestimmten kompartimentierten Pool von energiereichen Phosphaten unterliegt. Wieland und Portenhauser konnten an isolierten Rattenlebermitochondrien zeigen, daß der aktivierende Effekt von Entkopplern auf die Interkonversion der Pyruvatdehydrogenase durch α -Ketoglutarat aufgehoben werden konnte (64), während α -Ketoglutarat am isolierten Enzym keine Wirkung zeigte. Die Bedeutung des α -Ketoglutaratspiegels bzw. des Flusses durch die α -Ketoglutaratdehydrogenase für die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase zeigt sich auch bei den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen: Infusion von Ammoniumchlorid senkt den α -Ketoglutaratgehalt insbesondere im mitochondrialen Kompartiment und bedingt einen Anstieg der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase; Infusion von Glutamin erhöht den α -Ketoglutaratspiegel bzw. den Fluß von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA und gleichzeitig wird die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase gesenkt.

Kürzlich wurde gezeigt, daß α -Ketovaleriansäure (50 mM) an Rattenlebermitochondrien den Pyruvattransport über die Mitochondrienmembran zu 60 % hemmt. Ähnlich verhält sich α -Ketoisocapronsäure (95). Möglicherweise ist dieser Effekt auch mit anderen α -Ketosäuren, z. B. α -Ketoglutarat, zu erzielen. Eine Erklärung der ammoniumchlorid-induzierten Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase auf Grund einer solchen Transporthemmung erscheint jedoch unwahrscheinlich wegen der benötigten unphysiologisch hohen Konzentrationen an α -Ketosäuren.

Aus dem bisher Gesagten läßt sich die Hypothese ableiten, daß in der intakten Leberzelle derjenige ATP Pool, der mit der Pyruvatdehydrogenase reagiert, mit dem Stoffwechsel von α -Ketoglutarat in Zusammenhang steht. Diese Verbindung könnte vermittelt werden durch das System der Substratphosphorylierung, d. h. durch die GTP-Bildung an der Succinyl-CoA-Synthetase. Der Effekt von Ammoniumionen wäre demnach eine Deinhibierung der Pyruvatdehydrogenase aufgrund eines Absinkens der α -Ketoglutaratkonzentration durch die Aktivität der Glutamatdehydrogenase.

Hiermit steht in Einklang, daß die $K_{0.5}$ (NH_4Cl) für die Pyruvatmehraufnahme, für das Absinken des α -Ketoglutaratspiegels und auch für

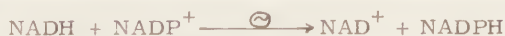
Oxidation der Pyridinnukleotide etwa gleich ist. Diese Erklärung läßt sich auch anwenden auf die übrigen Übergänge der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase während Infusion von Glutamin (das heißt intrazelluläre Bildung von α -Ketoglutarat, Glutamat und Ammoniak mit Hilfe der Glutaminase, der Glutamatoxalacetattransaminase und der Glutamamatdehydrogenase (96 - 99)) und von Ammoniumchlorid - sei es während Glucogenese aus Pyruvat, bei gleichzeitiger Gabe von Aminoxyessigsäure, während gehemmter Harnstoffproduktion, oder während Anoxie, welche die Bereitstellung energiereicher Phosphate lediglich über die Substratkettenphosphorylierung gewährt.

Interessant in diesem Zusammenhang ist, daß Olson und Allgyer bei Versuchen mit isolierten Rattenlebermitochondrien zu der Hypothese gelangten, daß die NAD-abhängige Oxidation von Substraten durch den mitochondrialen GTP-Spiegel reguliert wird (100). Die Untersucher postulierten eine hemmende Wirkung von GTP auf die Dihydrolipoyldehydrogenase (101). GTP hat jedoch an der isolierten Pyruvatdehydrogenase keine regulatorische Wirkung (59). Möglicherweise sind aber Succinyl-CoA-Synthetase und Nukleosiddiphosphatkinase oder GTP-AMP-Phosphotransferase miteinander gekoppelt. Smith et al. fanden jedoch an isolierten Rattenlebermitochondrien, daß die Nukleosiddiphosphatkinasereaktion nicht im Gleichgewicht sei. Damit erhebt sich die Unsicherheit, ob die Nukleosiddiphosphatkinase in der Lage ist eine stationäre Umwandlungsrate von GTP in ATP aufrechtzuerhalten (102).

Kürzlich fanden Taylor et al. an isolierten Rattenlebermitochondrien ein Absinken der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase in Gegenwart von 5 mM β -Hydroxybutyrat oder 1 mM Glutamat, und zeigten einen Anstieg der Aktivität in Gegenwart von 2.5 mM Acetoacetat (65). Ammoniumchlorid hatte, wenn überhaupt, eine nur leicht aktivierende Wirkung. Die Effekte bei Gabe der Ketonkörper und von Glutamat auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase waren jedoch von keiner entsprechenden Änderung im mitochondrialen ATP/ADP begleitet. Die Untersucher interpretierten daher die gefundene Aktivitätsänderung als Folge eines veränderten mitochondrialen NADH/NAD Verhältnisses. Wie aus Abb. 18 ersichtlich, ist der Einfluß von β -Hydroxybutyrat oder Acetoacetat auf

die $^{14}\text{CO}_2$ Abgabe aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat gering, jedoch beeinflussen beide Metabolite die ammoniumchloridbedingte Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase beträchtlich. Da außerdem die Glutamatdehydrogenase in erster Linie mit NADPH und nicht mit NADH reagiert, ist eine Erklärung der ammoniumionenabhängigen Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase durch eine Oxidation im mitochondrialen NADH/NAD System nicht wahrscheinlich. Pettit et al. (72) berichteten kürzlich für die isolierte Pyruvatdehydrogenase aus Rinderniere und -herz einen Anstieg der Aktivität von 53 % auf 62 % der Gesamtaktivität durch Senkung des NADH/NAD von 1.0 auf 0.1. Aus dem Absinken von β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat von 1.0 auf 0.8 (vgl. Abb. 10 c) während Infusion von 1.5 mM Ammoniumchlorid errechnet sich nach Bücher (fig. 14 in (86)) jedoch lediglich ein Absinken des mitochondrialen NADH/NAD von 0.5 auf 0.38 (E_0' des mitochondrialen NADH-Systems = - 307 mV).

Bei einer maximalen Harnstoffproduktion von $1.1 \mu\text{Mol} \times (\text{min})^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$ werden (nach Abb. 2) $1.1 \mu\text{Mol} \times (\text{min})^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$ mitochondriales NADPH im stationären Zustand oxidiert. Um die Harnstoffproduktion in Gang zu halten, ist eine ständige Nachlieferung von NADPH mit dieser Flußgeschwindigkeit nötig (Abb. 2). Dies geschieht zumindest zum Teil über die Transhydrogenasereaktion (103):



Mögliche Effekte von Ammoniumionen auf die Pyruvatdehydrogenaseaktivität durch Änderungen der Konzentration an freiem Mg^{++} und Ca^{++} können nicht ausgeschlossen werden. Eine Erhöhung der freien Mg^{++} -Konzentration aufgrund eines gesenkten ATP-Spiegels während Ammoniumchloridinfusion scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen, da kaum Veränderungen im Gewebsgehalt von ADP und ATP zu finden sind.

Bei Perfusion mit $[\text{Laktat}] = [\text{Pyruvat}] = 0.3 \text{ mM}$ scheint Entzug von exogenem CO_2 keinen Einfluß auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase zu haben, während die $^{14}\text{CO}_2$ Produktion aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat um etwa ein Drittel absinkt. Aufgrund des ähnlichen Verlaufes der Pyruvataufnahme während Ammoniumchloridinfusion bei Verwendung von HEPES oder Bikarbonatpuffer ergibt sich kein Hinweis, daß CO_2 , das dritte

Produkt der Pyruvatdehydrogenasereaktion, einen Einfluß auf den Aktivitätszustand der Pyruvatdehydrogenase hat.

Die Ammoniakkonzentration im Pfortaderblut der Ratte beträgt 0.26 mM (55). Da der halbmaximale Effekt von Ammoniumchlorid auf die Pyruvatnettoaufnahme bei 0.5 - 0.7 mM erreicht wird, sollte eine Änderung der Ammoniakkonzentration im Pfortaderblut - wie z. B. bei Muskelarbeit oder verstärkter Tätigkeit der intestinalen Flora - gegensinnig die mitochondriale α -Ketoglutaratkonzentration und gleichsinnig die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase und damit die Acetyl-CoA-Produktion aus Pyruvat beeinflussen. Ein solcher Zusammenhang würde zur Homöostase des Zitronensäurezyklus beitragen.

4.2. Ammoniakbilanz

Injektion von Ammoniumsalzen bei lebenden Ratten bedingt einen Anstieg des Lebergehaltes an Alanin und Aspartat (55, 57, 91, 104) während in der perfundierten Leber kein Anstieg von Aspartat zu finden ist (44). Auch bei den dieser Arbeit vorliegenden Versuchen spielen Transaminierungsreaktionen hinsichtlich der Ammoniak- und Kohlenstoffixierung bei Gabe von Ammoniumchlorid im stationären Zustand eine zu vernachlässigende Rolle. Der Stoffwechsel der von der Leber netto aufgenommenen Ammoniumionen führt zu 90 - 95 % zu Harnstoff. Weniger als 5 % finden sich in den Aminosäuren wieder. Die Ammoniumionenaufnahme errechnet aus der pH-Registrierung entspricht der enzymatisch gemessenen Harnstoffproduktion. Die zusätzliche Pyruvataufnahme während Ammoniumchloridinfusion bleibt unbeeinflusst durch Aminooxyessigsäure und hat innerhalb von 2 Minuten ein Plateau erreicht, während der Alanin- und Aspartatgehalt der Rattenleber bei Ganztiersversuchen noch nach 5 Minuten anstieg (57).

Die Harnstoffproduktion geht einher mit einer Mehratmung, wie sie etwa dem theoretischen Energieverbrauch (4 Mol ATP pro Mol gebildeten Harnstoff bei Annahme eines $P/O = 3$) entspricht. Grunzt et al. fanden ebenfalls Übereinstimmung zwischen erwartetem und gefundenem Sauerstoffverbrauch bei Gabe von 1.5 mM Ammoniumchlorid im geschlosse-

nen System mit 4 g Rinderalbumin in 100 ml Perfusat (105). Hems et al. (7) hingegen fanden bei Gabe von 10 mM Ammoniumchlorid einen 2,5fach höheren Sauerstoffverbrauch als theoretisch für die Harnstoffbildung zu erwarten. Diese Diskrepanz ist noch unerklärt, da in unseren Versuchen die Sauerstoffaufnahme auch bei Infusion von 10 mM Ammoniumchlorid immer noch etwa der Harnstoffproduktion entsprach.

Bei Ersatz des Bikarbonatpuffers durch HEPES findet keine Sauerstoffmehraufnahme, keine Nettoaufnahme von Ammoniumionen und keine Harnstoffproduktion statt aufgrund der $K_M(\text{HCO}_3^-) = 5.3 \text{ mM}$ für die Carbamylphosphatsynthetase - einem hohen Wert verglichen mit dem für die Pyruvatcarboxylase oder das malic enzyme (76). Entzug von exogen zugeführtem CO_2 hat praktisch keinen Einfluß auf die Laktat-, Pyruvat-, Glucose-, Alanin- und Glutaminkonzentration im ausfließenden Perfusat, lediglich die $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung aus 1- ^{14}C -Pyruvat liegt um ein Drittel tiefer. Auch die Gewebsgehalte der Adeninnukleotide und von Glutamat bleiben unbeeinflusst, dagegen liegt der α -Ketoglutaratgehalt tiefer. Möglicherweise liegt dies in dem bei Verwendung zwitterionischer Puffersysteme gesenkten intrazellulären pH begründet (54). Die Hemmung der Harnstoffproduktion bei Fehlen von exogen zugeführtem CO_2 könnte bei klinischen Zuständen mit gesenktem Bikarbonatspiegel - z. B. bei metabolischer Azidose (Diabetes) - die Harnstoffproduktion verschlechtern.

Hinsichtlich der Toxizität des Ammoniaks kann gesagt werden, daß Ammoniak keine entkopplerähnlichen Eigenschaften besitzt, da die Sauerstoffaufnahme auch bei 10 mM Ammoniumchlorid noch der Harnstoffproduktion entsprach. Es findet sich lediglich eine Annäherung des Sauerstoffmehrer Verbrauchs an die Asymptote $P/O=2$ bei Ammoniumchloridkonzentrationen höher als 1,5 mM. Außerdem bedingt Ammoniumchlorid bei Perfusion mit HEPES keine Mehratmung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Stoffwechsel von zugesetzten Ammoniumionen wurde am intakten System der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber untersucht. Dabei spielt die Harnstoffsynthese in der Stickstoffbilanz die weit überwiegende Rolle. Neben der Fixierung von Ammoniumionen an der Carbamylphosphatsynthetase war die Fixierung an der Glutamatdehydrogenase von besonderem Interesse.
2. Die bei der Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen obligat ablaufende reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat an der Glutamatdehydrogenase verläuft unter Verbrauch von mitochondrialem NADPH, während NADH eine nur untergeordnete Rolle (ca. 10 %) spielt.
3. Die Harnstoffproduktion erreicht einen maximalen Wert von $1,1 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber})^{-1}$. Die Harnstoffsynthese geht einher mit einer Mehratmung, welche der theoretisch zu erwartenden entspricht (4 Mol ATP/Mol Harnstoff; P/O = 3). Damit geht die energetische Bilanz auf, eine "Entkopplung" durch Ammoniumionen tritt somit nicht auf.
4. Zusatz freier Ammoniumionen bewirkt einen Anstieg der aktiven (Dephospho-) Form der Pyruvatdehydrogenase. Dies wurde belegt durch Aktivitätsmessungen im Gewebe, durch eine gesteigerte Nettopyruvataufnahme durch die Leber und durch erhöhte $^{14}\text{CO}_2$ Abgabe aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat. Für die zusätzliche Pyruvataufnahme beträgt die $K_{0,5}(\text{NH}_4\text{Cl}) = 0,5 - 0,7 \text{ mM}$. Der Effekt ist rasch, reversibel und durch Aminoxyessigsäure nicht zu beeinflussen. Dieser neu beschriebene Effekt stellt die größte bisher bekannte metabolische Veränderung des Aktivitätsgrades der Pyruvatdehydrogenase dar.
5. Umgekehrt ist im Einklang damit eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase bei Stoffwechsel von Glutamin zu beobachten, wobei intrazellulär Ammoniumionen, Glutamat und α -Ketoglutarat freigesetzt werden.

6. Alle Befunde sind zu erklären durch Änderung des α -ketoglutarat-abhängigen Stoffwechsels. Es wird daher vorgeschlagen, daß die ammoniakbedingte Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase nicht direkt am Multienzymkomplex sondern indirekt über noch nicht näher definierte, mit der α -Ketoglutaratoxidation zusammenhängende Metabolite (z. B. GTP) bewirkt wird. Die inverse Beziehung zwischen Pyruvatoxidation und α -Ketoglutaratspiegel würde zur Homöostase des Zitronensäurezyklus beitragen.

6. LITERATURHINWEISE

- (1) Bachmann C. (1974) in *Hereditary Disorders of Amino Acid Metabolism: Patterns of Clinical Expression and Genetic Variation* (Nyhan, W.L., ed.) pp. 361 - 386, A. Wiley Biomed. - Health-Publication, John Wiley & Sons, New York, London, Sidney, Toronto.
- (2) Ruderman, N.B. (1975) in *Ann. Rev. of Med.* (Creger, W.P., ed.) 26, 245 - 258, *Ann. Rev. Inc.*, Palo Alto, USA.
- (3) Pitts, R.F. (1973) in *Handbook of Physiology* (Orloff, J., Berliner, W.R. & Geiger, S.R., eds.) Section 8, pp. 455 - 496. American Physiological Society, Washington.
- (4) Imley, M. & Szam, J. (1974) *Neue Erkenntnisse des Ammoniakstoffwechsels*, Witzstock Verlag, Baden-Baden.
- (5) Wieland, O.H., Patzelt, C. & Löffler, G. (1972) *Eur. J. Biochem.* 26, 426 - 433.
- (6) Söling, H.-D., Bernhard, G. & Sanson, G. (1971) *FEBS Lett.* 13, 201 - 203.
- (7) Hems, R., Ross, B.D., Berry, N.M. & Krebs, H.A. (1966) *Biochem. J.* 101, 284 - 292.
- (8) Scholz, R. (1967) *Hämoglobinfreie Durchströmung der isolierten Rattenleber und Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung*, Habilitationsschrift.
- (9) Bücher, Th., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O. & Sies, H. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27, 301 - 317.
- (10) Sies, H., Häussinger, D. & Grosskopf, M. (1974) *Hoppe-Seyl. Z. Physiol. Chem.* 355, 305 - 320.

- (11) Häussinger, D., Weiss, L. & Sies, H. (1975)
Eur. J. Biochem. 52, 421 - 431.
- (12) Krebs, H.A. & Henseleit, H. (1932) Z. Physiol. Chem. 210,
33 - 66.
- (13) Brauser, B. (1968), Anal. Chem. 237, 8 - 17.
- (14) Chance, B., Mayer, D. & Rossini, L. (1970) in IEEE Trans-
actions on Bio-Medical Engineering, Vol. BME-17, pp. 118 -
121.
- (15) Johnson, D. & Lardy, H. (1967), Meth. Enzymol. X, 94 - 96.
- (16) Kalra, J. & Brosnan, J.T. (1973), FEBS Lett. 37, 325 - 328.
- (17) Bergmeyer, H.U., ed. (1974) Methoden der Enzymatischen
Analyse, 3rd edn., Verlag Chemie, Weinheim.
- (18) Kirsten, E., Gerez, C. & Kirsten, R. (1963) Biochem. Z. 337,
312 - 319.
- (19) Summer, K.H. (1973) Diplomarbeit, Tübingen.
- (20) Williamson, J. R. & Corkey, B.E. (1969) in Meth. in Enzymol.
(Lowenstein, J.M., ed.) Vol. XIII, 434 - 513, Academic Press,
London, New York.
- (21) Weiss, L., Löffler, G. & Wieland, O.H. (1974)
Hoppe-Seyl, Z. Physiol. Chem. 355, 363 - 377.
- (22) Curthoys, N.P. & Lowry, O.H. (1973), J. Biol. Chem. 248,
162 - 168.
- (23) Kornblatt, J.A., Bernath, P. & Katz, J. (1964) Int. J.
Applied Radiation and Isotopes 15, 191 - 201.

- (24) Scholz, R., Kaltstein, A., Schwabe, U. & Thurman, R.G. (1974) in Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems (Thurman, R.G., Williamson, J. R. & Chance, B., eds.) pp. 315 - 328, Academic Press, Inc., New York and London.
- (25) Knox, W.E. (1972) in Enzyme Patterns in Fetal, Adult and Neoplastic Rat Tissues (Knox, W.E., ed.) S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sidney.
- (26) Williamson, D.H., Lund, P. & Krebs, H.A. (1967) Biochem. J. 103, 514 - 523.
- (27) Krebs, H.A. (1971) Adv. Enz. Reg. 10, 397 - 420.
- (28) Seyama, S., Kuroda, Y. & Katunuma N. (1972) J. Biochem. 72, 1017 - 1027.
- (29) McGivan, J.D., Bradford, N.M., Crompton, M. & Chappell, J.B. (1973), Biochem. J. 134, 209 - 215.
- (30) Kerson, L.A. & Appel, S.H., (1968) J. Biol. Chem. 243, 4279 - 4285.
- (31) Krebs, H.A. (1966), Adv. Enz. Reg. 5, 409 - 434.
- (32) Start, C. & Newsholme E.A. (1968), Biochem. J. 107, 411 - 415
- (33) Schimke, R.T. (1962), J. Biol. Chem. 237, 459 - 468.
- (34) Bonetti, E., Abbondanza, A., Della Corte, E. & Stirpe, F. (1969), Biochem. J. 115, 597 - 601.
- (35) Meister, A. (1974), in The Enzymes (Boyer, P.D., ed.) 10, pp. 699 - 754, Academic Press, New York und London.
- (36) Kvamme, E. & Torgner J.A. (1974), Biochem. J. 137, 525 - 530.

- (37) Kvamme, E. & Torgner, J.A. (1975), *Biochem. J.* 149, 83 - 91.
- (38) Tornheim, K. & Lowenstein, J.M. (1972),
J. Biol. Chem. 247, 162 - 169.
- (39) Mendez Mourão, J., McGivan, J.D. & Chappell, J.B. (1975)
Biochem. J. 146, 457 - 464.
- (40) Katunuma, N., Huzino, A. & Tomino, J. (1967)
Adv. Enz. Reg. 5, 55 - 69.
- (41) Delbrück, A., Schimassek, H., Bartsch, K. & Bücher, Th.
(1959), *Biochem. Z.* 331, 297 - 311.
- (42) Klingenberg, M. & Pette, D. (1962)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 430 - 432.
- (43) Tager, J.M. & Papa, S. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 99, 570 - 572.
- (44) Chamalaun, R.A.F.M. & Tager, J.M. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 222, 119 - 134.
- (45) Krebs, H.A., Hems, R. & Lund, P. (1973)
Adv. Enz. Reg. 11, 361 - 377.
- (46) Charles, R., Tager, J.M. & Slater, E.C. (1967)
Biochim. Biophys. Acta 131, 29 - 41.
- (47) Lehninger, A.L., & Gamble, J.G. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 610 - 618.
- (48) Raijman, L. (1974) *Biochem. J.* 138, 225 - 232.
- (49) Azzi, A., Chappell, J.B. & Robinson, B.H. (1967)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 148 - 152.

- (50) LaNoue, K.F., Meijer, A. J. & Brouwer, A. (1975)
Arch. Biochem. Biophys. in press.
- (51) Meijer, A.J., Brouwer, A., Reijngoud, D.J., Hoek, J.B.
& Tager, J.M. (1972) Biochim. Biophys. Acta 283, 421 - 429.
- (52) Borst, P. (1963) in Funktionelle und Morphologische Organisation der Zelle (Karlson, P., ed.) pp. 137 - 162, Springer Verlag, Berlin.
- (53) Sies, H. & Noack, G. (1972), FEBS Lett. 22, 193 - 196.
- (54) Sies, H., Noack, G. & Halder, K.H. (1973)
Eur. J. Biochem. 38, 247 - 258.
- (55) Lund, P., Brosnan, J.T. & Eggleston L.V. (1970) in Essays in Cell Metabolism (Bartley, W., Kornberg, H.L. & Quayle, J.R., eds.) pp. 167 - 188, Wiley Interscience, London, New York, Sidney, Toronto.
- (56) Williamson, J.R., Ohkawa, K. & Meijer, A.J. (1974) in Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems (Thurman, R., Yonetani, T., Williamson, J.R., & Chance, B., eds.) pp. 365 - 381, Academic Press Inc., New York and London.
- (57) Brosnan, J.T. & Williamson, D.H. (1974) Biochem. J. 138, 453 - 462.
- (58) Walajtys, E.J., Gottesman, D.P. & Williamson, J.R. (1974)
J. Biol. Chem., 249, 1857 - 1865.
- (59) Reed, L.J., Linn, T.C., Hucho, F., Namihira, G., Barrera, R.C., Roche, T.E., Pelley, J.W. & Randall, D.D. (1972) in Metabolic Interconversion of Enzymes (Wieland, O., Helmreich, E. & Holzer, H., eds.) pp. 281 - 293, Springer Verlag Berlin.

- (60) Linn, T.C., Pelley, J.W., Pettit, F.H., Hucho, F., Randall, D.D. & Reed, L.J. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 148, 327 - 342.
- (61) Hucho, F., Randall, D.D., Roche, T.E., Burgett, M.W., Pelley, J.W. & Reed, L. J. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 151, 328 - 340.
- (62) Portenhauser, R. & Wieland, O. (1972) Eur. J. Biochem. 31, 308 - 314.
- (63) Linn, T.C., Pettit, F.H., Hucho, F. & Reed, L.J. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 64, 227 - 234.
- (64) Wieland, O.H. & Portenhauser, R. (1974) Eur. J. Biochem. 45, 577 - 588.
- (65) Taylor, S.J., Mukherjee, C. & Jungas, R.L. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2028 - 2035.
- (66) Hucho, F. (1974) Eur. J. Biochem. 46, 499 - 505.
- (67) Pettit, F.H., Roche, T.E. & Reed, L.J. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 567 - 571.
- (68) Linn, T.C., Pettit, F.H., & Reed, L.J. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 62, 234 - 241.
- (69) Bremer, J. (1969), Eur. J. Biochem. 8, 535 - 540.
- (70) Wieland, O., v. Jagow-Westermann, B. & Stukowski, B. (1969) Hoppe Seyl. Z. Physiol. Chem. 350, 329 - 334.
- (71) Garland, P.B. & Randle, P.J. (1964), Biochem. J. 91, 6c.

- (72) Pettit, F.H., Pelley, J.W. & Reed, L.J. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 575 - 582.
- (73) Roche, T.E. & Reed, L.J. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 1341 - 1348.
- (74) Patzelt, C. Löffler, G. & Wieland, O.H. (1972)
Eur. J. Biochem. 33, 117 - 122.
- (75) Sies, H. & Häussinger, D. (1974), Hoppe-Seyler's Z. Physiol.
Chem. 355, 1256 - 1257.
- (76) Utter, M.F., Keech, D.B. & Scrutton, M.C. (1964) Adv. Enz.
Reg. 2, 49 - 68, Pergamon Press.
- (77) Guthöhrlein, G. & Knappe, J. (1969), Eur. J. Biochem. 8,
207 - 214.
- (78) Sies, H. (1971), Chem.-Biol. Interactions 3, 308 - 309.
- (79) Williams, J.H. & Woodbury, D.M. (1971), J. Physiol. 212,
85 - 99.
- (80) Koberstein, R. & Sund, H. (1973) Eur. J. Biochem. 36,
545 - 552.
- (81) Brocklehurst, J.R., Dodd, G.H., Freedman, R.B., Malcolm,
A.D.B., Price, N.C. & Radda, G.K. (1970) in Pyridine
Nucleotide Dependent Dehydrogenases (Sund, H., ed.) pp. 257 -
266, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- (82) Fisher, H.F. (1973) Advan. Enzymol. 39, 369 - 417.
- (83) Cross, D.G. (1972) J. Biol. Chem. 247, 784 - 789.

- (84) Avi-Dor, Y., Olson, J.M., Doherty, M.D. & Kaplan, N.O.
(1962) J. Biol. Chem. 237, 2377 - 2383.
- (85) Estabrook, R.W. (1962) Anal. Biochem. 4, 231 - 245.
- (86) Bücher, Th. (1970) in Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases (Sund, H. ed.) pp. 439 - 461, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- (87) Scholz, R. & Bücher, Th. (1965) in Control of Energy Metabolism (Chance, B., Estabrook, R.W. & Williamson, J.R., eds.) pp. 393 - 414, Academic Press, New York, London.
- (88) Flohé, L. & Schlegel, W. (1971)
Hoppe-Seyl. Z. Physiol. Chem. 352, 1401 - 1410.
- (89) Katunuma, N., Katsunuma, T., Tomino, J. & Matsuda, J.
(1968) in Adv. Enz. Reg. (Weber, G., ed.) 6, 227 - 242,
Pergamon Press.
- (90) Charles, R., (1968), Mitochondriale Citrullin Synthese:
Een Ammoniak Fixerend en ATP Verbruikend Proces, Ph. D.
Thesis, Amsterdam, Rototype, Amsterdam.
- (91) Nordmann, R., Petit, M.A. & Nordmann, J. (1972)
Biochimie 54, 1473 - 1478.
- (92) Petit, M.A., Nordmann, J. & Nordmann, R. (1974)
Biochimie 56, 1155 - 1157.
- (93) Häussinger, D. & Sies, H. (1975) in Vorbereitung
- (94) Documenta Geigy Wissenschaftliche Tabellen (1973), 7. Auflage,
p. 515. Ciba-Geigy Lim., Basel.

- (95) Mowbray, J. (1974) FEBS Lett. 44, 344 - 347.
- (96) De Haan, E.J., Tager, J.M. & Slater, E.C. (1967)
Biochim. Biophys. Acta 131, 1 - 13.
- (97) Blackburn, E.H. & Hird, F.J.R. (1972) Arch. Biochem.
Biophys. 152, 258 - 264.
- (98) Lueck, J.D. & Miller, L.L. (1970) J. Biol. Chem. 245,
5491 - 5497.
- (99) Parilla, R. & Goodman, M.N. (1974) Biochem. J. 138,
341 - 348.
- (100) Olson, M.S. & Allgyer, T.T. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 1582 - 1589.
- (101) Olson, M.S. & Allgyer, T.T. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 1590 - 1597.
- (102) Smith, C.M., Bryla, J. & Williamson, J.R. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 1497 - 1505.
- (103) Sies, H., Summer, K.H. & Bücher, Th. (1975) FEBS Lett. 54,
274 - 278.
- (104) DuRuisseau, J.P., Greenstein, J.P., Winitz, M. & Birnbaum,
S.M. (1957) Arch. Biochem. Biophys. 68, 161 - 171.
- (105) Grunst, J., Eisenburg, J. & Holl, J. (1974) in Neue Erkennt-
nisse des Ammoniakstoffwechsels (Imley, M. & Szam, J., eds.)
pp. 199 - 207, Witzstrock Verlag, Baden-Baden.

Meinem hochgeschätzten Lehrer, Herrn Priv.-Doz. Dr. Helmut Sies, danke ich herzlichst für die wertvolle Beratung und für seine stets aufgeschlossene Haltung mir und dieser Arbeit gegenüber.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher zolle ich großen Dank für lehrreiche Diskussionen.

Für kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre im Labor sowie die gute Zusammenarbeit bei Messungen danke ich Herrn Karl-Heinz Summer und Herrn Max Großkopf sowie Frau Annegret Marklstorfer und Frau Ingrid Linke.

Enzyme

AMP-Deaminase	E. C. 3.5.4.6.
Asparaginase	E. C. 3.5.1.1.
Argininosuccinatsynthetase	E. C. 6.3.4.5.
Carbamylphosphatsynthetase	E. C. 2.7.2.5.
Glutamatdehydrogenase	E. C. 1.4.1.3.
Glutamatoxalacetattransaminase	E. C. 2.6.1.1.
Glutamatpyruvattransaminase	E. C. 2.6.1.2.
Glutaminase	E. C. 3.5.1.2.
Glutaminketosäuretransaminase	
+ w-Oxidase	E. C. 2.6.1.15.
Glutaminsynthetase	E. C. 6.3.1.2.
Glutathionperoxidase	E. C. 1.11.1.9.
Glutathionreduktase	E. C. 1.6.4.2.
Glycogenphosphorylase	E. C. 2.4.1.1.
β -Hydroxybutyratdehydrogenase	E. C. 1.1.1.30.
α -Ketoglutaratdehydrogenase	E. C. 1.2.4.2.
Laktatdehydrogenase	E. G. 1.1.1.27.
NAD(P) Transhydrogenase	E. C. 1.6.1.1.
Nukleosiddiphosphatkinase	E. C. 2.7.4.6.
Pyruvatcarboxylase	E. C. 6.4.1.1.
Pyruvatdehydrogenase	E. C. 1.2.4.1.
Succinyl-CoA-Synthetase	E. C. 6.2.1.4.
Urease	E. C. 3.5.1.5.
malic enzyme	E. C. 1.1.1.38.

Abkürzungen

Hepes: N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-Äthansulfonsäure
DMO: 5,5-Dimethyl-2,4-oxazolidindion

LEBENS LAUF

Geboren am 22. 6. 1951 in Nördlingen als Sohn des Angestellten Konrad Häußinger und dessen Ehefrau Margot, geborene Wöhler.

Besuch der Knabenvolksschule Nördlingen von 1957 - 1961, anschließend Besuch des Theodor-Heuss-Gymnasiums Nördlingen. Dort Ablegung der Reifeprüfung 1970.

Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilian-Universität München im Wintersemester 1970/71.

Ablegung der naturwissenschaftlichen Vorprüfung nach dem Sommersemester 1971.

Ablegung der ärztlichen Vorprüfung nach dem Wintersemester 1972/73.

Im Mai 1973 Beginn der Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Sies am Institut für Physiologische Chemie und Biochemie der Universität München.

Ablegung des Medizinischen Staatsexamens an der Universität München am 18. 6. 1976.

